

**Hovedfagsoppgave i farmakognosi for graden cand.pharm.**

***Erythrina senegalensis* – En medisinplante fra Mali**

**Del A: Identifisering av bioaktive komponenter i rotbark**

**Del B: Etnofarmakologiske studier**



**Berte Hedding**

**Avdeling for farmasøytisk kjemi – fagområde farmakognosi**

**Farmasøytisk Institutt**

**Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet**

**Universitet i Oslo**

**2007**

---

Hovedfagsoppgave i farmakognosi for graden cand.pharm.

***Erythrina senegalensis* – En medisinsplante fra Mali**

**Del A: Identifisering av bioaktive komponenter i rotbark**

**Del B: Etnofarmakologiske studier**



**Berte Hedding**

**Utført ved**

**Avdeling for farmasøytisk kjemi – fagområde farmakognosi**

**Farmasøytisk Institutt**

**Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet**

**Universitet i Oslo**

**2007**

**Veiledere**

**Professor Karl Egil Malterud**

**Professor Berit Smestad Paulsen**

**Professor Drissa Diallo**

**Post.doc Helle Wangensteen**

## Forord

Først vil jeg rette en stor takk til Karl Egil Malterud og Helle Wangensteen for god veiledning og hjelp under utførelsen av hovedfaget. Gjennom engasjert veiledning har dere bidratt til å gjøre dette til et spennende, interessant og ikke minst lærerikt hovedfagsår.

Jeg vil også takke Berit Smestad Paulsen og Drissa Diallo for at dere muliggjorde de etnofarmakologiske studiene i Mali, og bidro til å gjøre oppholdet i Mali til en uforglemmelig opplevelse.

Ellers vil jeg takke Frode Rise på Kjemisk Institutt for hjelp til å gjennomføre 2-dimensjonal NMR spektroskopi, og Léon Reubsaet ved Farmasøytisk Institutt for gjennomføring av LC/MS-analysene.

Takk til reisefølget mitt i Mali, Anne Sveaass, Ragnhild Kårvatn Evjenth og Ingvild Austarheim for godt selskap og en fantastisk tur, som vi sent vil glemme.

Tilslutt vil jeg takke alle ansatte ved avdelingen for hyggelig selskap og stor hjelpsomhet gjennom hele hovedfagsåret.

Oslo, 25.oktober 2007



Berte Hedding

# Innholdsfortegnelse

<b>1. SAMMENDRAG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. HENSIKT MED OPPGAVEN .....</b>	<b>2</b>
<b>3. BAKGRUNN.....</b>	<b>3</b>
3.1 <i>ERYTHRINA SENEGALENSIS</i> DC .....	3
3.2 LOKALE NAVN.....	3
3.3 BOTANISKE FORHOLD.....	4
3.4 TRADISJONELL BRUK.....	5
3.5 TIDLIGERE FUNN .....	6
3.5.1 <i>Identifiserte innholdsstoffer</i> .....	6
3.5.2 <i>Biologisk aktivitet</i> .....	9
3.5.2.1 Hemming av fosfolipase C $\gamma$ 1 aktivitet .....	9
3.5.2.2 Cytotoksisitet .....	9
3.5.2.3 Antitrypanosomal aktivitet .....	9
3.5.2.4 Antiplasmodial aktivitet.....	10
3.5.2.5 Antibakteriell aktivitet .....	10
3.5.2.6 Smertestillende effekt .....	10
3.5.2.7 Anti-inflammatorisk effekt .....	10
<b>4. EKSPERIMENTELT.....</b>	<b>11</b>
4.1 MATERIALER.....	11
4.1.1 <i>Kjemikalier</i> .....	11
4.1.2 <i>Apparatur</i> .....	13
4.2 METODER.....	16
4.2.1 <i>Generelle metoder</i> .....	16
4.2.1.1 Analytisk tynnsjiktskromatografi (TLC).....	16
4.2.1.2 Ceric spraying .....	17
4.2.1.3 Inndamping av fraksjoner .....	18
4.2.2 <i>Fraksjoneringsmetoder</i> .....	18
4.2.2.1 VersaFlash kolonneseparasjon .....	18
4.2.2.2 Sentrifugalt akselerert tynnsjiktskromatografi (TLC-Thin Layer Chromatography) .....	20
4.2.2.3 Preparativ tynnsjiktskromatografi (TLC-Thin Layer Chromatography) .....	21
4.2.2.4 Preparativ væskechromatografi (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) .....	22
4.2.3 <i>Identifikasjonsmetoder</i> .....	23
4.2.3.1 NMR spektroskopi.....	23
4.2.3.2 Massespektrometri.....	26
4.2.4 <i>Metoder for måling av biologisk aktivitet</i> .....	29
4.2.4.1 DPPH-scavenging.....	29
4.2.4.2 15-Lipoksygenasehemming .....	30
4.2.4.3 Adenosin deaminase (ADA) hemming .....	32
4.2.4.4 Toksisitetsassay (Brine shrimp lethality assay).....	34
4.2.4.5 Antifungal test.....	35
4.2.4.6 Antibakteriell test.....	38
4.3 EKSPERIMENTELL UTFØRELSE .....	40
4.3.1 <i>Utgangsmateriale</i> .....	40
4.3.2 <i>Fraksjonering av metanolrækstraktet</i> .....	41
4.3.3 <i>Fraksjonering av diklormetanrækstraktet</i> .....	42
4.3.4 <i>Videre separasjon av fraksjon 6</i> .....	45
4.3.5 <i>Videre arbeid med fraksjon 6.2 og 6.3</i> .....	46
4.3.6 <i>Videre separasjon av fraksjon 6.8</i> .....	46
4.3.7 <i>Videre separasjon av fraksjon 6.8.4</i> .....	47
4.3.8 <i>Videre separasjon av fraksjon 7</i> .....	48
4.3.9 <i>Videre separasjon av fraksjon 7.1</i> .....	49
4.3.10 <i>Videre separasjon av fraksjon 7.2</i> .....	49
4.3.11 <i>Videre separasjon av fraksjon 7.2.3</i> .....	50

4.3.12	Videre arbeid med fraksjon 7.3.....	51
4.3.13	Videre separasjon av fraksjon 7.3.2.....	52
4.3.14	Videre separasjon av fraksjon 7.3.3.....	53
4.3.15	Videre separasjon av fraksjon 8.....	53
4.3.16	Videre separasjon av fraksjon 8.4.....	55
4.3.17	Videre separasjon av fraksjon 8.4.2.....	55
4.3.18	Videre separasjon av fraksjon 11.....	56
4.3.19	Videre separasjon av fraksjon 11.2.....	56
4.3.20	Videre arbeid med fraksjon 11.2.7 – 11.2.9.....	58
4.3.21	Videre separasjon av fraksjon 11.2.3.....	59
4.3.22	Videre separasjon av fraksjon 11.2.4.....	59
4.3.23	Videre arbeid med fraksjon 11.2.3.4, 11.2.3.5 og 11.2.4.1.....	59
<b>5.</b>	<b>RESULTATER OG DISKUSJON .....</b>	<b>61</b>
5.1	ISOLASJON, STRUKTUROPPLARING OG BIOASSAY .....	61
5.1.1	Utgangsmateriale.....	61
5.1.2	Fraksjonering av metanolrækstraktet .....	62
5.1.3	Fraksjonering av diklormetanrækstraktet.....	64
5.1.4	Videre arbeid .....	66
5.1.5	Videre separasjon av fraksjon 6.....	67
5.1.6	Videre arbeid med fraksjon 6.2 og 6.3 (6.2+3).....	68
5.1.7	Videre separasjon av fraksjon 6.8.....	68
5.1.8	Videre separasjon av fraksjon 6.8.4.....	69
5.1.9	Videre separasjon av fraksjon 7.....	69
5.1.10	Videre separasjon av fraksjon 7.1.....	70
5.1.10.1	Erybraedin A.....	73
5.1.11	Videre separasjon av fraksjon 7.2.....	74
5.1.12	Videre separasjon av fraksjon 7.2.3.....	75
5.1.12.1	Erybraedin D.....	79
5.1.13	Videre arbeid med fraksjon 7.3.....	80
5.1.14	Videre separasjon av fraksjon 7.3.2.....	81
5.1.15	Videre separasjon av fraksjon 7.3.3.....	82
5.1.16	Videre separasjon av fraksjon 8.....	82
5.1.17	Videre separasjon av fraksjon 8.4.....	84
5.1.18	Videre separasjon av fraksjon 8.4.2.....	84
5.1.19	Videre arbeid med fraksjon 8.4.2.2.....	85
5.1.20	Videre separasjon av fraksjon 11.....	93
5.1.21	Videre separasjon av fraksjon 11.2.....	94
5.1.22	Videre arbeid med fraksjon 11.2.7 – 11.2.9.....	95
5.1.22.1	Erybraedin C.....	99
5.1.23	Videre separasjon av fraksjon 11.2.3.....	101
5.1.23.1	Eryvarin K .....	103
5.1.24	Videre separasjon av fraksjon 11.2.4.....	104
5.1.25	Videre arbeid med fraksjonene 11.2.3.4, 11.2.3.5 og 11.2.4.1.....	104
<b>6.</b>	<b>ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER.....</b>	<b>107</b>
6.1	INNLEDNING .....	107
6.2	ETNOFARMAKOLOGI .....	108
6.3	MALI .....	108
6.4	TRADISJONELL MEDISIN I MALI.....	109
6.5	RESULTATER .....	111
<b>7.</b>	<b>KONKLUSJON .....</b>	<b>117</b>
7.1	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID .....	118
<b>8.</b>	<b>VEDLEGG .....</b>	<b>119</b>

8.1	FLYTSKJEMA .....	119
8.1.1	<i>Flytskjema 1</i> .....	119
8.1.2	<i>Flytskjema 2</i> .....	120
8.1.3	<i>Flytskjema 3</i> .....	121
8.1.4	<i>Flytskjema 4</i> .....	122
8.1.5	<i>Flytskjema 5</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
8.2	NMR- OG MS-SPEKTRA .....	124
8.3	ANTIBAKTERIELLTEST .....	142
<b>9</b>	<b>REFERANSELISTE .....</b>	<b>143</b>

# 1 Sammendrag

Barken fra planten *Erythrina senegalensis* er benyttet i tradisjonell medisin i Vest-Afrika. I denne studien var utgangspunktet metanol- og diklormetanrækstrakt av rotbarken til denne planten. Rækstraktene ble separert og fraksjonert ved hjelp av kolonnekromatografi, og fraksjonene ble undersøkt med NMR-spektroskopi. Utvalgte fraksjoner fra diklormetanrækstraktet ble separert og fraksjonert videre med ulike fraksjoneringsteknikker (kolonnekromatografi, væskechromatografi og tynnsjiktchromatografi), og forbindelser ble isolert. De isolerte forbindelsene ble strukturoppklart ved  $^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -NMR-spektroskopi og massespektrometri. Det ble isolert en ny forbindelse som ble strukturoppklart med de nevnte teknikker, i tillegg til 2-dimensjonal NMR-spektroskopi (HSQC og HMBG). Rækstraktene og alle fraksjonene fra disse etter den første fraksjoneringen ble testet for radikalscavengeraktivitet overfor 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). De allerede kjente isolerte forbindelsene og diklormetanrækstraktet ble også testet for antioksidantaktivitet ved å teste deres evne til å hemme enzymet 15-lipoksygenase (15-LO) fra soyabønner. Disse ble i tillegg testet for antibakteriell aktivitet mot *Staphylococcus aureus*. Diklormetanrækstraktet og forbindelsen erybraedin C ble testet for toksisitet (Brine Shrimp lethality assay) og adenosin deaminase (ADA) hemming.

Pterocarpanene erybraedin A, erybraedin C, erybraedin D og eryvarin K ble isolert fra diklormetanrækstraktet, i tillegg ble det isolert et ikke tidligere beskrevet pterocarpan fra dette ekstraktet, med det systematiske navnet 9-hydroksy-8-metoksy-6',6'-dimetylpyrano[2',3':3,4]pterocarpan. Av disse forbindelsene er det bare erybraedin A som tidligere har blitt isolert fra *E. senegalensis*.

Diklormetanrækstraktfraksjonene viste høyere grad av radikalscavengeraktivitet enn fraksjonene fra metanolrækstraktet og det ble derfor fokusert på disse i det videre arbeidet. Diklormetanrækstraktet og de kjente isolerte forbindelsene viste høy grad av antioksidant- (15-LO-hemming) og antibakteriell aktivitet mot *S. aureus*. Diklormetanrækstraktet og erybraedin C viste økt grad av toksisitet sammenlignet med blankprøve. Diklormetanrækstraktet ga ADA-hemming ( $\text{IC}_{50} = 89 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ ) men erybraedin C var tilnærmet inaktiv.

## 2 Hensikt med oppgaven

Denne oppgaven er basert på og er en videreføring av en hovedfagsoppgave i farmakognosi med tittelen ”*Erythrina Senegalensis* – En medisinsplante fra Mali. Undersøkelse av antifungale komponenter og etnofarmakologiske studier”, utført ved Department of Traditional Medicine (DMT) i Bamako, Mali og ved Universitet i Oslo (UiO), Norge, skrevet av Annette Theis i 2006.

Hensikten med oppgaven var å isolere og identifisere innholdsstoffer i den maliske planten *Erythrina senegalensis* og å utføre ulike bioaktivitetstester på disse stoffene. I tillegg skulle det samles inn informasjon om medisinsk bruk av planten under feltarbeid i Mali.



### 3 Bakgrunn

#### 3.1 *Erythrina senegalensis* DC

*Erythrina senegalensis* tilhører familien Fabaceae (erteblomstfamilien). Fullstendig systematikk for planten er gitt under (ITIS 2007).

Rike:	Plantae (planteriket)
Underrike:	Tracheobionta (karplanter)
Divisjon:	Magnoliophyta (blomsterplanter, dekkfrøet)
Klasse:	Magnoliopsida (tofrøbladet)
Underklasse:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familie:	Fabaceae (erteblomstfamilien)
Slekt:	<i>Erythrina</i>
Art:	<i>senegalensis</i>

#### 3.2 Lokale navn

Mali:

N'té, n'tièmè, furudolen, surudolen, turudolen, siridolen, zoroblen, muso-n'tièmè, zemen, zemeba, n'gumè, donitulu, sindian

Fransk:

Arbre corail

### 3.3 Botaniske forhold

*Erythrina senegalensis* er et savannetre som forekommer i alle deler av det tropiske Vest-Afrika og inn i de østlige deler av Kamerun.

Treet kan bli opptil 15 meter høyt, men er vanligvis en del lavere, ca 6-7 meter. Det har stamme med tykk, korkaktig og lys bark med tilbakekrummede korte, spisse utvekster og dype sprekker.

Sevjeveden er gul, myk og porøs og angripes lett av insekter. Kuttet den i har den til å begynne med en sterk ubehagelig lukt. Kryss-snittet viser konsentriske linjer grunnet fibrøse bånd. Kjerneveden er rød. Løvverket består av kraftige, vekselstilte bladstilk som er 3-6 cm lange og noe tykkere nederst. Bladene er ovale, 5-10 cm lange og 3-5 cm brede og ordnet i tripletter, det midterste bladet er ofte noe større enn de to på sidene. Treet bærer iøynefallende, store røde blomster i racemer på bladløse skudd eller sammen med de første bladene. Belgfruktene er smale, kraftig bøyde og 8-15 cm lange. Klarrøde, ovale frø er synlige fra utsiden. Frøene er giftige på grunn av sitt innhold av alkaloider med curare-lignende effekt.

I naturen vokser *E. senegalensis* spredt og trærne står vanligvis alene. Ved planting av kvister vokser treet lett og raskt, og brukes som hekk, til avgrensning av områder og kveginnhegninger. Utseendet gjør at treet også benyttes mye som prydtre. (Burkill 1985; Maydell 1990)



**Bilde 1:** *Erythrina senegalensis*, fotografert i Mali, Afrika 2007

### 3.4 Tradisjonell bruk

*E. senegalensis* er en plante med flere ulike anvendelsesområder i områdene hvor den vokser, her har den også en utstrakt bruk som medisinplante.

Historisk sett har saft fra frøene blitt brukt som pilgift på grunn av sitt innhold av  $\beta$ -erythroidin som har curare-lignende effekt (Okpako 1999).

I Nord-Nigeria plantes treet for å markere gravplasser og noen folkeslag mener treet har magiske egenskaper (Burkill 1985).

Som medisinplante brukes *E. senegalensis* ved mange ulike indikasjoner, blant annet brukes sevje fra bladene for sårheling (Gambia og Senegal), suppe av bark og blader for å kurere barnløshet (Ghana og Nigeria), dekokt av blader mot blennorrhea (Mali), fisk tilberedt i dekokt av bark mot dysenteri (Sierra Leone og Nigeria), macerat av stammebarken ved amenorrhea (Senegal), dekokt av bark som styrkedrikk (Elfenbenskysten), tygget ved som afrodisiakum (Elfenbenskysten), dekokt av bark eller røtter ved spedalskhet (Elfenbenskysten) og bark eller kjerneved mot gulsott (Nigeria) (Burkill 1985). Det er også rapportert om bruk mot malaria, bronkitt, feber og rakitt (Maydell 1990).

I en undersøkelse utført i området rundt Bamako i Mali i 2005 hvor healere ble intervjuet om sin bruk av medisinplanter ble det kun oppgitt noen få indikasjoner på bruk av *E. senegalensis*.

Indikasjonene amenorrhea, urinveis bilharziose og sterilitet var de som ble oftest nevnt av healerne. (Togola et al. 2005).

### 3.5 Tidligere funn

*E. senegalensis* er en plante som det i det siste halve århundret har blitt utført relativt mange studier på. Dette gjør at mange innholdsstoffer er identifisert og strukturopklart. Man har også funnet at planten innehar ulike biologiske aktiviteter.

#### 3.5.1 Identifiserte innholdsstoffer

Under følger en oversikt over forbindelser tidligere isolert fra *E. senegalensis*, gruppert etter hvilken stoffgruppe de tilhører. Det er i tillegg angitt hvilken del av planten forbindelsen har blitt isolert fra.

##### *Alkaloider:*

Erysodine -Frø	(Folkers et al. 1941), (Wandji et al. 1995c)
-------------------	----------------------------------------------

Erysopine -Frø	(Folkers et al. 1941)
-------------------	-----------------------

Hypaphorine -Frø	(Folkers et al. 1941), (Wandji et al. 1995c)
---------------------	----------------------------------------------

Glucoerysodine -Frø	(Wandji et al. 1995c)
------------------------	-----------------------

##### *Isoflavonoider:*

Warangalone -Stammebark	(Fomum et al. 1985), (Wandji et al. 1994a)
----------------------------	-----------------------------------------------

2,3-Dihydroauriculatin -Stammebark	(Taylor et al. 1986)
---------------------------------------	----------------------

Auriculatin -Stammebark	(Taylor et al. 1986), (Wandji et al. 1994a), (Wandji et al. 1994c), (Oh et al. 1998), (Oh et al. 1999)
----------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6,8-Diprenylgenistein (5,7,4-Trihydroxy-6,8-diprenylisoflavone) -Stammebark	(Taylor <i>et al.</i> 1986), (Fomum <i>et al.</i> 1986), (Wandji <i>et al.</i> 1994b), (Oh <i>et al.</i> 1999), (Oh <i>et al.</i> 2005)
Senegalensin -Stammebark	(Wandji <i>et al.</i> 1990), (Wandji <i>et al.</i> 1994c)
Erysenegalensein D -Stammebark	(Wandji <i>et al.</i> 1994b), (Oh <i>et al.</i> 1999), (Oh <i>et al.</i> 2005)
Erysenegalensein E -Stammebark	(Wandji <i>et al.</i> 1994b)
8-Prenylluteone -Stammebark	(Wandji <i>et al.</i> 1994b), (Oh <i>et al.</i> 1998)
Erysenegalensein F Erysenegalensein G -Stammebark	(Wandji <i>et al.</i> 1994a)
Erysenegalensein H Erysenegalensein I -Stammebark	(Wandji <i>et al.</i> 1994c)
Erysenegalensein B Erysenegalensein C -Stammebark	(Wandji <i>et al.</i> 1995a)
Erysenegalensein J Erysenegalensein K -Stammebark	(Wandji <i>et al.</i> 1995b)
Erysenegalensein L Erysenegalensein M -Stammebark	(Wandji <i>et al.</i> 1995c)
Erysenegalensein N Erysenegalensein O Erysenegalensein D Derrone Alpinumisoflavone -Alle: Stammebark	(Oh <i>et al.</i> 1999), (Oh <i>et al.</i> 2005)

Erybraedin A  
Shinpterocarpin/Phaseollin  
-Rotbark

(Theis 2006)

*Flavanoner:*

Erythrisenegalone  
-Stammebark

(Fomum et al. 1985), (Wandji *et al.* 1994c)

Senegalensein  
-Stammebark

(Fomum et al. 1987)

Lupinifolin  
-Stammebark

(Wandji *et al.* 1994c)

*Triterpener:*

$\beta$ -amyrin  
Maniladiol  
Erythrodiol  
Oleanolic acid  
Cornulacic acid  
-Alle: Stammebark

(Wandji *et al.* 1995b)

*Estere:*

Erythrinasinate  
-Stammebark

(Fomum *et al.* 1986)

*n*-Triacontyl 4-cinnamate  
Langkjedet ester av ferula syre  
-Stammebark

(Wandji et al. 1990)

*N-nitrosaminer:*

N-nitrosodimethylamine

(Atawodi 2003)

### 3.5.2 Biologisk aktivitet

Arten *Erythrina* er godt kjent for sitt innhold av alkaloider med curare-lignende effekt (Dyke 1981), den senere tid er det også isolert stoffer tilhørende andre stoffgrupper, blant annet isoflavanoider, som er testet for ulike biologiske aktiviteter. For mer detaljer enn de her angitte om de ulike biologiske aktiviteter *E. senegalensis* har vist, se fjorårets hovedoppgave på samme tema (Theis 2006).

#### 3.5.2.1 Hemming av fosfolipase $C\gamma 1$ aktivitet

Fosfolipase C (PLC) spiller en vital rolle i transmembran signaloverføring, den katalyserer reaksjoner som induserer en serie hendelser som til slutt fører til DNA syntese, cellevekst og celledifferensiering. Mye tyder på at PLC-relaterte oncogene produkter og overuttrykking av disse fører til fremvekst av kreft (carcinogenesis) hos mennesker. (Oh et al. 2005)

Erysenegalensein O, erysenegalensein D, erysenegalensein N, derrone og 6,8-diprenylgenistein isolert fra *E. senegalensis* har i in vitro forsøk vist hemming av enzymet fosfolipase  $C\gamma 1$  (PLC $\gamma 1$ ). De samme stoffene viste også hemming av dannelse av inositol fosfater (IPt) i NIH3T3 fibroblastceller med overuttrykking av PLC $\gamma 1$ . (Oh et al. 2005).

Auriculatin og 8-prenylluteone isolert fra *E. senegalensis* har også i in vitro forsøk vist hemming av enzymet PLC $\gamma 1$  og hemming av dannelse av IPt i overuttrykkende NIH3T3 fibroblastceller. (Oh et al. 1998)

#### 3.5.2.2 Cytotoksisitet

Auriculatin og 8-prenylluteone isolert fra *E. senegalensis* viste moderat cytotoksisitet mot flere humane tumorcelle linjer i in vitro forsøk. (Oh et al. 1998)

#### 3.5.2.3 Antitrypanosomal aktivitet

Protozoparasittene *Trypanosoma gambiense* og *Trypanosoma rhodesiense* er årsak til sykdommen afrikansk sovesyke. Dette er en sykdom som ubehandlet har dødelig utfall og som, selv om antall

nye tilfeller per år har gått ned de siste årene, i mange afrikanske land utgjør en betydelig helsetrussel for befolkningen. (WHO 2006)

Etanol rækstrakt av *E. senegalensis* har vist antrypanosomal aktivitet in vitro. (Atindehou *et al.* 2004)

#### 3.5.2.4 *Antiplasmodial aktivitet*

Protozoparasittene i familien *Plasmodium species* er årsaken til malaria, en sykdom som over en million mennesker dør av hvert år og som har stor utbredelse i afrikanske land særlig de sub-Sahariske. (WHO 2007)

Etanol rækstrakt av *E. senegalensis* har vist antiplasmodial aktivitet in vitro. (Atindehou *et al.* 2004)

Metanolekstrakt av *E. senegalensis* stammebark viste antiplasmodial aktivitet mot en multidrug resistent stamme av *Plasmodium falciparum*. (Ajaiyeoba *et al.* 2005)

#### 3.5.2.5 *Antibakteriell aktivitet*

Etanolekstrakt av *E. senegalensis* rot viste antibakteriell aktivitet overfor stammer av *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* og *Bacillus subtilis*. (Kone *et al.* 2004)

#### 3.5.2.6 *Smertestillende effekt*

Vandig ekstrakt av *E. senegalensis* stammebark viste in vivo smertestillende effekt. (Saidu *et al.* 2000)

#### 3.5.2.7 *Anti-inflammatorisk effekt*

Vandig ekstrakt av *E. senegalensis* stammebark viste in vivo anti-inflammatorisk effekt. (Saidu *et al.* 2000)



## 4 Eksperimentelt

### 4.1 Materialer

#### 4.1.1 Kjemikalier

Aceton purum	Chemi-Teknik AS Oslo, Norge
d6-Aceton	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
Aqua-Biosal havsaltblanding	AB – Aqua Teknik Berg, Tyskland
Artemia salina egg (rekelarve egg)	JBL GmbH & CO KG Tyskland
Bariumklorid	Merck Darmstadt, Tyskland
Boratbuffer (0,2 M natriumborat, pH 9)	Farmasøytisk Institutt Oslo, Norge
Butanol	Merck Darmstadt, Tyskland
Candida albicans Culti-Loops	Oxoid Limited Hampshire, England
Ceric reagens (1 % cerium(IV)sulfat i 10 % vandig svovelsyre)	Farmasøytisk Institutt Oslo, Norge
Destillert vann	Farmasøytisk Institutt Oslo, Norge
Diklormetan	Sigma – Aldrich Seelze, Tyskland
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck Darmstadt, Tyskland
DPPH	Sigma – Aldrich St.Louis, USA
Eddiksyre	VWR International Oslo, Norge
Etanol	Arcus Oslo, Norge
Etylacetat	Sigma – Aldrich Seelze, Tyskland
Heksan	Merck Darmstadt, Tyskland
Kloroform	Sigma – Aldrich Seelze, Tyskland

d-Kloroform (CDCl <sub>3</sub> )	Sigma – Aldrich St.Louis, USA
Kumarsyre	Fluka AG, Buchs SG Sveits
Linolsyre	Sigma – Aldrich St.Louis, USA
Lipoxidase type 1-B fra soyabønne, L-7395 15-Lipoxygenase	Sigma – Aldrich St.Louis, USA
Maltekstrakt	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Metanol	Merck Darmstadt, Tyskland
Metanol purum	Chemi-Teknik AS Oslo, Norge
MTT (dimethylthiazolyldiphenyltetrazolium bromid) – Del av Cell Proliferation Kit 1	Roche Mannheim, Tyskland
Müller Hinton agar støpt i petriskål	Norges Veterinærhøgskole Oslo, Norge
Natriumklorid	Chemi-Teknik as Oslo, Norge
N <sub>2</sub> -gass	AGA Oslo, Norge
Sabouraud 2 % glukoseagar støpt i petriskål	Norges Veterinærhøgskole Oslo, Norge
Silika gel 60 PF <sub>254</sub> med gips	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Sulconazol nitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Tyskland
Svovelsyre 98 %	VWR International Frankrike
Tetrametylsilan (TMS)	Sigma – Aldrich Seelze, Tyskland

## 4.1.2 Apparat

<i>Analytisk tynnsjiktskromatografi (TLC)</i> Silika gel 60 F <sub>254</sub> , aluminiumsplater Silika gel 60 F <sub>254</sub> , glassplater RP – 18 F <sub>254</sub> S, aluminiumsplater Elueringskar, glass TLC sprayer	Merck, Darmstadt, Tyskland  Ukjent leverandør Camag, Muttenz, Sveits
<i>Automatpipetter</i> Finnpiette  Nichiryo modell 8100  Eppendorf pipette	Labsystems, Helsinki, Finland Nichiryo, Tokyo, Japan Eppendorf – Netheler – Hinz GmbH Hamburg, Tyskland
<i>Filterpapir</i> Whatman, diverse størrelser	Whatman, Maidstone, England
<i>HPLC</i> Varian Prostar Pumpe modell 210 <i>-Analytisk</i> Detektor Analytic 9x0mm Analytisk kolonne Varian 250x4,6 mm microorb mv 100-5 C18 Hamilton 705SN 50µl sprøyte <i>-Preparativ</i> Detektor Prep 9x1mm Preparativ kolonne Varian dynamax 250x21,4 mm microorb 60-8 C18 Varian 1002 TLL 2,5ml sprøyte	Varian, Walnut Creek, CA, USA
<i>Kolonnekromatografi</i> Versaflash kolonneholder  Büchi 681 kromatografi pumpe  UA – 6 detektor Retriever 500 fraksjonsoppsamler  Versapak silikakolonne  Versapak C18 kolonne	Supelco, Bellefonte, PA, USA Büchi, Flawil, Sveits Teledyne Isco. Lincoln, NE, USA  Supelco, Bellefonte, PA, USA Supelco, Bellefonte, PA, USA

<i>Kyvetter</i> Kvartskyvetter	Starna, Essex, England
<i>Magnetrører</i> RCT Basic	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
<i>Massespektrometri</i> LC/MS: Finnigan LCQ Duo  UltiMate 3000  Analytisk kolonne Varian 250x4,6 mm microsorb mv 100-5 C18 MS (Kjemisk institutt): Micromass Prospec Q	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA Dionex Sunnyvale, USA Varian, Walnut Creek, CA, USA  Waters (Micromass), Manchester, UK
<i>NMR</i> Varian Gemini 200  Bruker DPX 300 Bruker AVII 600	Varian, Palo Alto, CA, USA Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Tyskland
<i>Oljepumpe</i> Edwards E-Lab 2	Edwards High Vacuum International, Sussex, England
<i>Ristemaskin</i> IKA-VIBRAK-VXR	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
<i>Rotavapor</i> Rotavapor – R med varmebad B – 480  Ilmvac 400171 vakuumpumpe	Büchi, Flawil, Sveits Ilmvac, Ilmenau, Tyskland
<i>Sentrifugalt akselerert tynnsjikt-kromatografi</i> Chromatotron 7924 T TLC glassplate Flowmeter Skilletrakt, 250 ml	Harrison Research, Palo Alto, CA, USA
<i>Sterilfilter</i> Millex-FG 0,20 µm	Millipore Bedford, USA
<i>Ultralydbad</i> Bransonic 220	Branson Ultrasonics Corp. Geneve, Sveits

<i>UV-apparat</i> UV-spektrofotometer: Shimadzu UV 160A Temperaturregulator: Shimadzu CPS-controller Kyvetteholder: Shimadzu CPS-240A	Shimadzu, Kyoto, Japan
<i>UV-lampe</i> Model UVSL-58 (254 og 366 nm)	Ultra Violet Products, San Gabriel, CA, USA
<i>Varmeplate</i> Ika-Combimag RCT	Janke & Kunkel Staufen, Tyskland
<i>Varmeskap</i> Varmeovn Heraeus  Varmeovn Termaks	Heraeus, Hanau, Tyskland Termaks Bergen, Norge
<i>Vekt</i> Sartorius model BP221S  Mettler PM4800 DeltaRange	Sartorius, Göttingen, Tyskland Mettler – Toledo Greifensee, Sveits

## 4.2 Metoder

### 4.2.1 Generelle metoder

#### 4.2.1.1 Analytisk tynnsjiktskromatografi (TLC)

##### Prinsipp

Kromatografi er et samle navn på separasjonsmetoder som er basert på det prinsipp at stoffene som skal separeres fordeler seg mellom to faser, hvorav den ene fasen er mobil mens den andre fasen er stasjonær.

I TLC (Thin Layer Chromatography) er mobilfasen en væske og stasjonærfasen ligger som et tynt lag på en plate, vanligvis rektangulær, av glass, plast eller metall. Platene er vanligvis 20 x 20 cm og vanlig tykkelse på sjiktet er 250 µm. Silika er den mest brukte stasjonærfasen, den kan brukes enten til normalfase- eller omvendtfasekromatografi, da med kjemisk bundne faser som C-2, C-8 og C-18. Ved normalfasekromatografi er stasjonærfasen polar og mobilfasen upolar, og omvendt ved omvendtfasekromatografi.

Prøver og standarder løses i egnet løsningsmiddel og påsettes som flekker eller bånd nær og like langt fra den ene sidekanten av platen. Løsningsmiddelet dampes av og platen settes med påsetningskanten ned i et kar som inneholder mobilfasen og har tett lokk slik at man får en mettet atmosfære. Nivået av mobilfasen må være lavere enn avstanden mellom platekanten og de påsatte flekkene. Når platen kommer i kontakt med mobilfasen vil mobilfasen trekkes oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. Komponentene i prøven vil bli transportert med ulik hastighet, og dermed separert, ut i fra i hvilken grad de interagerer med stasjonær- og mobilfasen. Når mobilfasen nærmer seg øvre platekant tas platen ut og mobilfasen dampes av. De ulike komponentene i prøven kan så detekteres visuelt eller instrumentelt. Platen kan også fremkalles med ulike reagenser, et eksempel på dette er spraying med ceric reagens. (Greibrokk et al. 1998)

##### Utførelse

Ønsket mobilfase ble laget og overført til elueringskaret minst ti minutter før TLC platen skulle settes i, dette for å sikre at det i karet er en mettet atmosfære av mobilfase. På TLC platen ble det

avmerket med blyant hvor prøvene skulle påsettes, til prøvopåsetting ble det benyttet kapillærrør størrelse 10 µl. Det ble påsatt ca 10-20 µl av hver prøve løst i egnet løsningsmiddel.

Løsningsmiddelet ble dampet av ved lufttørking og platen ble så satt ned i elueringskaret med prøvekannten nederst. Når mobilfasen var nådd opptil ca 2 cm fra toppkanten ble TLC platen tatt ut og tørket, enten bare lufttørking eller også med hårføner. Når mobilfasen var dampet fullstendig av ble TLC platen betraktet i kortbølget (254 nm) og langbølget (366 nm) UV-lys, flekker ble merket av med blyant. Platen ble så sprayet med Ceric reagens og oppvarmet. Etter fremkalling ble platen scannet og lagret på data. Denne metoden ble benyttet for å avgjøre hvilke mobilfaser som var fornuftig å bruke ved de ulike separasjonsmetoder, og hvilke fraksjoner som kunne slås sammen etter at separasjonen var gjennomført.

### Reagenser

Diklormetan og/eller metanol ble brukt som løsningsmiddel til prøvene. Ved testing av fraksjoner etter ulike separasjonsmetoder ble det tatt prøver direkte fra fraksjonene. Mobilfasene bestod av ulike løsningsmidler i ulike blandingsforhold, som for eksempel metanol, diklormetan, etylacetat og kloroform.

#### 4.2.1.2 *Ceric spraying*

### Prinsipp og utførelse

Ceric reagens (cerium(IV)sulfat i vandig svovelsyre) vil oksidere de fleste organiske forbindelser til fargede forbindelser. Syren i reagenset inngår også muligens i en red-oksreaksjon, men den fullstendige mekanismen er ukjent (Greibrokk *et al.* 1998). TLC plater som var ferdig utviklet og betraktet i kort- og langbølget UV-lys ble sprayet med ceric reagens og lagt i varmeskap i 10-15 minutter ved 100°C. Platene ble så betraktet visuelt og flekker ble avmerket med blyant.

### Reagenser

Ceric reagens: Cerium(IV)sulfat 1 %, løst i 10 % vandig svovelsyre.

#### 4.2.1.3 Inndamping av fraksjoner

##### Prinsipp

Ved avdamping av løsningsmiddelet i fraksjoner som fremkommer etter gjennomføring av en separasjonsmetode kan rotavapor benyttes. Etter prøven er inndampet til tørrhet, ettertørkes den på oljepumpe for å sikre at det ikke er løsningsmiddelrester igjen.

##### Utførelse

Etter gjennomføring av de ulike separasjonsmetoder og sammenslåing av like fraksjoner ble fraksjonene dampet inn på rotavapor med temperatur 30-50°C etter hvor stor andel av vann det var i fraksjonen. Deretter ble de ettertørket i ca 15 minutter på oljepumpe. Dette ble utført etter gjennomføring av alle de ulike separasjonsmetoder.

### 4.2.2 Fraksjoneringsmetoder

#### 4.2.2.1 VersaFlash kolonneseparasjon

##### Prinsipp

Kolonnekromatografi er en teknikk som benyttes for å separere stoffer i blanding. Kolonnen inneholder en finfordelt stasjonær fase og er tilknyttet en pumpe som sørger for at mobilfasen (elueringsmiddelet) drives gjennom. Når en prøve appliseres på kolonnen og elueres med et passende elueringsmiddel, vil de ulike forbindelsene i prøven vandre langs kolonnen med forskjellig hastighet på grunn av ulik interaksjon med kolonnematerialet og eluenten, dermed kan stoffene separeres (Greibrokk et al. 1998). De ulike fraksjoner samles opp etter hvert som mobilfasen elueres ut fra kolonnen. Elueringsmiddel velges ut fra hva som er passende for den aktuelle prøven, det er vanlig å bruke flere løsningsmidler i blanding, og dette kan testes på forhånd ved hjelp av analytisk tynnsjikt-kromatografi. Elueringen kan foretas isokratisk (samme mobilfase hele tiden) eller med gradient (endring av mobilfasesammensetning underveis). I VersaFlash kolonneseparasjon benytter man seg av ferdig pakke VersaPak kolonner, med polar eller upolar stasjonærfase, og Versaflash kolonneholder. VersaFlash kolonneseparasjon kan også kobles til en detektor, for eksempel en UV-detektor. Da kan prøven deles opp i fraksjoner ved å se på detektorresponsen.



## Kolonnemateriale:

- Silika

Silika, også kalt silikagel, kiselgel og porøst glass er det vanligste og mest brukte kolonnematerialet ved normalfase separasjon. Dette er et hydrofilt materiale med liten partikkelstørrelse. Uten kjemisk bundne faser vil det på overflaten finnes silanolgrupper (Si-OH) og siloxangrupper (Si-O-Si), silanolgruppene gjør overflaten svakt sur. Stoffer vil adsorbere til silika primært via hydrogenbindinger hvor overflatehydroksylene vanligvis vil være protondonorer. På grunn av den svakt sure overflaten vil aminer og andre baser bli sterkt adsorbent. (Greibrokk et al. 1998)

- C<sub>18</sub>

Dette kolonnematerialet har en upolar overflate og benyttes ved omvendt fase separasjon. De viktigste interaksjoner som finner sted mellom stoffene og stasjonærfasen er av typen van der Waals krefter, relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. Polare interaksjoner er av liten betydning, på grunn av det vandige system som motvirker slike interaksjoner. Dette innebærer at det i hovedsak er størrelsen på den upolare delen av molekylet som bestemmer retensjonen, jo større upolar del jo mer retensjon. (Greibrokk et al. 1998)

## Utførelse

Kolonnen som skulle benyttes ble kondisjonert med tre kolonnevolum (180 ml) av den første mobilfasen. Prøven ble løst i en liten mengde (noen ml) diklormetan og/eller metanol. Hvis prøven var filtrert på forhånd kunne den påføres på kolonnen via pumpen som ellers pumper mobilfase, var prøven ikke filtrert ble den påsatt rett på kolonnen ved hjelp av en engangssprøyte. Utover i kjøringen ble mobilfasens eluerende evne gjort sterkere og sterkere i forhold til kolonnemateriale, slik at de ulike komponentene i prøven kom ut litt etter litt. Fraksjonene ble samlet opp i prøveglass med størrelse 10-30 ml. Etter endt separasjon ble fraksjonene testet ved hjelp av analytisk tynnsjiktskromatografi, og det ble på den måten slått fast hvilke fraksjoner som kunne slås sammen. Etter sammenslåing ble fraksjonene dampet inn.

## Reagenser

Metanol/diklormetan til løsning av prøvene. Ulike løsningsmidler i blanding ble benyttet som mobilfase, de mest brukte var metanol, diklormetan, etylacetat og kloroform.

### 4.2.2.2 Sentrifugalt akselerert tynnsjiktskromatografi (TLC-Thin Layer Chromatography)

#### Prinsipp

Sentrifugalt akselerert tynnsjiktskromatografi baserer seg på samme prinsipp som analytisk tynnsjiktskromatografi, men i stedet for en rektangulær plate benyttes det her en som er sirkulær og denne roterer under elueringen. Selve elueringen foregår i et apparat som kalles en kromatotron, denne sørger for at platen har riktig hellningsvinkel og rotasjon. Prøven som ønskes separert påsettes innerst på platen gjennom et hull i lokket på kromatotronen og via en veke som går ned til platen. Etter påsetting av prøven kobles eluenten til samme sted og stoffer vil elueres utover på platen på vanlig måte, samtidig som sentrifugalkraften vil virke inn. Man kan enten ha en isokratisk eluering eller bruke gradient. Når stoffene når enden av plata vil de slynges ut og renne ut via et annet hull på nederste kant av kromatotronen, og fraksjoner kan samles opp. Lokket på kromatotronen har et område som er gjennomtrengelig for UV-lys, dermed kan man følge med på de ulike komponentenes bevegelse med en UV-lampe dersom de er synlige i kort- eller langbølget UV-lys.

#### Utførelse

Før denne metoden kunne utføres måtte TLC platene støpes, til dette ble det brukt silika gel pulver med gipstilsats, dette ble blandet med destillert vann og spredt utover glassplaten. Denne lufttørket først i en time og ble så tørket i varmeskap over natten. Neste dag ble platen høvlet til 2 mm tykkelse. Før prøven ble satt på ble platen kondisjonert med mobilfase. Prøven løst i egnet løsningsmiddel ble deretter påført TLC platen litt etter litt via veken. UV-lampe ble brukt til å se hvordan prøven delte seg opp i de ulike komponenter og til oppdeling i fraksjoner etter hvert som komponentene kom ut med mobilfasen. Hvis ikke en type mobilfase var sterk nok til å drive ut alle komponentene i prøven ble det byttet til en sterkere mobilfase underveis. Fraksjonene ble deretter dampet inn på rotavapor og oljepumpe.

## Reagenser

Silika gel 60 PF<sub>254</sub> med gipstilsats og destillert vann ble brukt til støping av TLC platene. Prøvene ble løst i egnet løsningsmiddel, vanligvis diklormetan og/eller metanol. Som mobilfase ble det brukt ulike løsningsmidler i ulike blandingsforhold, som diklormetan, kloroform, etylacetat og aceton.

### 4.2.2.3 Preparativ tynnsjiktskromatografi (TLC-Thin Layer Chromatography)

#### Prinsipp

Denne metoden baserer seg på samme prinsipp som analytisk tynnsjiktskromatografi, men i dette tilfellet brukes den som en preparativ separasjonsmetode. I stedet for at bare en liten mengde av den aktuelle prøven påsettes brukes hele mengden av prøven som man vil separere og den settes på platen(e) som et bånd langs den ene kanten og ikke som flekker. Blir båndet bredt kan man oppkonsentrere med utvikling opptil enden av prøvekannten med en sterk mobilfase. Etter endt utvikling av platen med egnet mobilfase tørkes platen. Man ser så på den i vanlig lys og kort- og langbølget UV-lys, og de ulike komponentene markeres. Sonene som er markert skrapes så av platen og blandes med aceton, dette filtreres deretter med sug. De ulike komponentene er da fordelt i ulike fraksjoner. For at det skal være mulig å skrape av stasjonærfasen bør glassplater benyttes.

#### Utførelse

Før påsetting av prøven ble TLC platen eluert med en mobilfase som er noe sterkere enn den som skulle benyttes for å fjerne eventuelle forurensninger, deretter ble den lufttørket. Prøven ble løst i egnet løsningsmiddel (noen ml) og påført som en linje med en pasteurpipette langs den ene kanten av platen. For å få smalest mulig prøvesone ble platen utviklet opp til øverste del av prøvekannten med aceton, dette gjør at prøven samler seg i et smalt bånd. Platen ble tørket og så utviklet med ønsket mobilfase opp til ca 2 cm fra øverste kant. Elueringskaret ble fylt med mobilfase ca 10-15 minutter før TLC platen ble plassert opp i for å sikre at det var en mettet atmosfære med mobilfase i karet. Etter endt eluering ble platen tatt ut og tørket. Fraksjonene som fremkom etter avskraping og filtrering ble dampet inn med rotavapor og oljepumpe.

## Reagenser

Prøvene ble løst i egnet løsningsmiddel, for eksempel diklormetan. Som mobilfase ble det brukt ulike løsningsmidler i ulike forhold, som for eksempel etylacetat og heksan i blanding. Aceton ble brukt til å oppkonsentrere prøvesonen.

### 4.2.2.4 Preparativ væskekromatografi (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)

## Prinsipp

Væskekromatografi baserer seg på samme prinsipp som kolonnekromatografi, dvs. at de ulike forbindelsene i prøven vil, ved eluering med mobilfase, vandre langs kolonnen med forskjellig hastighet på grunn av ulik interaksjon med kolonnematerialet og dermed separeres de ulike komponentene i prøven. Ved væskekromatografi vil det dannes et høyt trykk, ca 100-300 bar, i kolonnen pga. dens fysiske egenskaper. Ved utløpet av kolonnen er det koblet til en detektor som kan detektere de ulike komponentene etter hvert som de kommer ut med mobilfasen. Man kan da ut i fra detektorsignalene dele opp prøven i fraksjoner. Den mest anvendte type detektor registrerer absorbans av UV-lys. Og den mest anvendte kolonnetype er basert på omvendt fase kromatografi med kjemisk bundne stasjonærfaser. (Greibrokk et al. 1998)

## Utførelse

Kolonnen ble kondisjonert med valgt mobilfase i 15 minutter før applisering av prøven. Prøven løst i egnet løsningsmiddel, ca. 1 ml, ble injisert via injeksjonsloopen. Det ble benyttet både isokratisk og gradient eluering. Analytisk HPLC ble brukt til å finne en egnet mobilfase til preparativ kjøring, da ble kun et lite uttak av prøven som senere skulle separeres analysert, og dette ble utført på en analytisk HPLC kolonne, som er mindre enn preparative kolonner. Ved preparativ kjøring ble det sett på detektorresponsen underveis i kjøringen for å dele prøven opp i fraksjoner. Fraksjonene ble deretter dampet inn på rotavapor og oljepumpe.

## Reagenser

Prøvene ble løst i metanol, et minimum av diklormetan måtte benyttes for å få prøvene fullstendig løst. Som mobilfase ble det benyttet ulike blandingsforhold av metanol og destillert vann.

### 4.2.3 Identifikasjonsmetoder

#### 4.2.3.1 NMR spektroskopi

##### Prinsipp

NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroskopi er en verdifull metode for strukturoppklaring av organiske forbindelser og gir et kart over karbon-hydrogenbindingene i molekylet.

Alle atomkjerner som inneholder odde antall protoner/nøytroner har spinn (dvs. de spinner rundt sin egen akse) og oppfører seg dermed som små magneter. Eksempel på slike kjerner er  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  og  $^{31}\text{P}$ . Uten påvirkning fra et ytre magnetfelt vil de magnetiske kjernene ha tilfeldig orientert spinn, men plasseres en prøve med disse kjernene mellom polene til en sterk magnet vil kjernene få en bestemt orientering, omtrent som en kompassnål. En  $^1\text{H}$  eller  $^{13}\text{C}$  kjerne kan orientere seg slik at dens eget magnetfelt er parallelt eller antiparallelt med det ytre magnetfeltet. De to ulike retningene har ikke samme energi. Den parallelle orienteringen er noe lavere i energi og favoriseres derfor over den antiparallele. Hvis de orienterte kjernene bestråles med elektromagnetisk stråling med riktig frekvens vil energiabsorpsjon inntreffe og kjerner i den lavere energitilstanden vil flippe over til den høyere energitilstanden. Vi sier da at de magnetiske kjernene er i resonans med den påførte strålingen, derav navnet Nuclear Magnetic Resonance – Kjernemagnetisk Resonans. Den eksakte frekvensen som er nødvendig for å oppnå resonans er avhengig både av styrken til det ytre magnetiske feltet og kjernens identitet.

Alle atomkjerner i molekyler er omgitt av elektroner, og når et molekyl påføres et ytre magnetisk felt,  $B_{\text{påført}}$ , vil elektronene, som er i bevegelse, lage små, lokale magnetiske felt,  $B_{\text{lokalt}}$ . Disse lokale magnetiske feltene motvirker det ytre magnetiske feltet, slik at det magnetiske feltet som påvirker kjernen,  $B_{\text{effektiv}}$ , blir noe mindre.

$$B_{\text{effektiv}} = B_{\text{påført}} - B_{\text{lokalt}}$$

Vi sier da at kjernen blir skjermet fra full effekt av magnetfeltet. Siden alle atomkjerner i et molekyl har litt forskjellig elektronmiljø vil de også bli påvirket av ulike magnetfelt. NMR instrumentet

detekterer disse forskjellene og i NMR spekteret vil vi se distinkte signaler for alle kjerner som har ulikt elektronmiljø. NMR spektre viser påført feltstyrke økende fra venstre mot høyre, dvs. at kjerner i den venstre delen av spekteret er mindre skjermet enn de i den høyre delen. For å definere posisjonen til et NMR signal kalibreres spekteret med en referanse, vanligvis tetrametylsilan (TMS). Denne brukes som referanse i både  $^{13}\text{C}$  og  $^1\text{H}$  målinger fordi den i begge spektrene gir et enkelt signal som ligger til høyre, dvs. er mer skjermet, for signalene man vanligvis ser fra organiske forbindelser.

Den posisjonen i spekteret hvor en kerne gir signal kalles dets kjemiske skift ( $\delta$ ), det kjemiske skiftet som TMS gir opphav til er satt til  $\delta=0$ . Kjemisk skift er en relativ term og spektra fra ulike instrumenter med ulik magnetstyrke kan derfor sammenlignes.  $^1\text{H}$  spektre gir vanligvis signal i området  $\delta=0-15$  ppm og  $^{13}\text{C}$  spektre i området  $\delta=0-220$  ppm. Generelt gir elektronegative substituent, aromatiske karboner og protoner deskjerming (signaler til venstre i spekteret), mens atomer av alifatisk opphav gir skjerming (signaler til høyre i spekteret)

I  $^1\text{H}$  NMR spektre er arealet under signalet proporsjonalt med antallet protoner som er opphav til signalet. Ved å integrere arealet under signalet kan man måle det relative antallet protoner som er opphav til de ulike signalene i spekteret.

Signalene i  $^1\text{H}$ -NMR spekteret kan opptre som enkle topper (singletter), men kan også være delt i flere topper som dubletter, tripletter, doble dubletter og multipletter. Dette kalles spin-spin-splitting og årsaken til dette er interaksjonen, eller koblingen, mellom spinnene til kjerner som ligger i nærheten av hverandre. Dvs. at de små magnetfeltene til to nabokjerner vil påvirke hverandre og atomer med nabo med antiparallelt spinn i forhold til ytre felt vil gi signal ved en annen posisjon enn atomer med nabo med parallelt spinn. Magnetisk identiske proton kobler ikke med hverandre, for at to proton på samme C skal koble, og signalene splittes, må de være ulike. Denne splittingen av signaler kan ofte gi verdifull informasjon om strukturen til molekylet, og antall topper i et signal gir informasjon om hvor mange protoner som er i nabostilling til et bestemt proton. En hovedregel er at signalet fra et proton med  $n$  like naboer er splittet i  $n+1$  topper dersom avstanden i spekteret til atomet det kobler med er stor. Signaler nær hverandre vil splittes etter mer kompliserte regler (høyere ordens kobling).

Hvis et signal er delt i flere topper kaller vi avstanden mellom disse toppene for koblingskonstanten. Koblingskonstanter måles i Hz og ligger vanligvis mellom 0-18. Signalene til kjernene som påvirker hverandre vil ha topper med lik koblingskonstant. På den måten kan man se hvilke protoner som påvirker hverandre og dermed ligger i nabostilling. (McMurry 2000)

$^1\text{H}$ - og  $^{13}\text{C}$ -NMR målinger er eksempler på 1-dimensjonell NMR spektroskopi, andre typer 1-D NMR spektroskopi er COSY og APT. Det finnes også metoder for 2-dimensjonell spektroskopi, for eksempel HSQC og HMBC.

COSY (Correlated Spectroscopy) er proton-proton korrelasjonsspektroskopi og gir informasjon om alle koblinger mellom de ulike protoner i molekylet. I spekteret vil vi se protonenes kjemiske skift langs diagonallinjen. To protoner som kobler med hverandre vil gi et signal langs x- og y-aksen vinkelrett på signalene til de to protonene. (Williams og Fleming 1989)

APT (Attached Proton Test) gir en indikasjon på de ulike karbonatomenes kjemiske natur ved at signalene for primære og tertiære karbonatomer peker oppover, dvs. gir positive signaler og signalene for sekundære og kvarternære karbonatomer peker nedover, gir negative signaler. Signalene kommer ved karbonatomenes naturlige kjemiske skift.

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) er en NMR metode som baserer seg på  $^1\text{H}$  NMR- og  $^{13}\text{C}$  NMR-spekteret og gir informasjon om krysskoblinger mellom C og H. Spektrene ligger på hver sin akse og vi ser signaler i spekteret der hvor signaler for C og H som er bundet til hverandre møtes. Dette spekteret kan brukes oppklare bindingsmønsteret mellom C og H i molekylet.

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) er en NMR metode som viser koblinger mellom C og H som ligger 2, 3 og (4) bindingsavstander fra hverandre.  $^1\text{H}$  NMR- og  $^{13}\text{C}$  NMR-spekteret er også her på hver sin akse, og signaler opptrer i spekteret der hvor signaler til C og H som kobler møtes. Denne metoden brukes også til å oppklare bindingsmønsteret i molekylet.

## Utførelse

Prøvene som skulle analyseres ved hjelp av NMR spektroskopi var inndampede fraksjoner etter gjennomføring av de ulike separasjonsmetoder. Prøvene ble løst i ca 1 ml deuterert kloroform tilsatt TMS, var prøven ikke løselig i dette ble den løst i deuterert aceton og tilsatt TMS. Løsningen ble overført til NMR-rør og analysert på et NMR-spektrometer. Spektrene ble analysert og sammenlignet med litteraturreferanser.

## Reagenser

Deuterert kloroform, deuterert aceton og TMS.

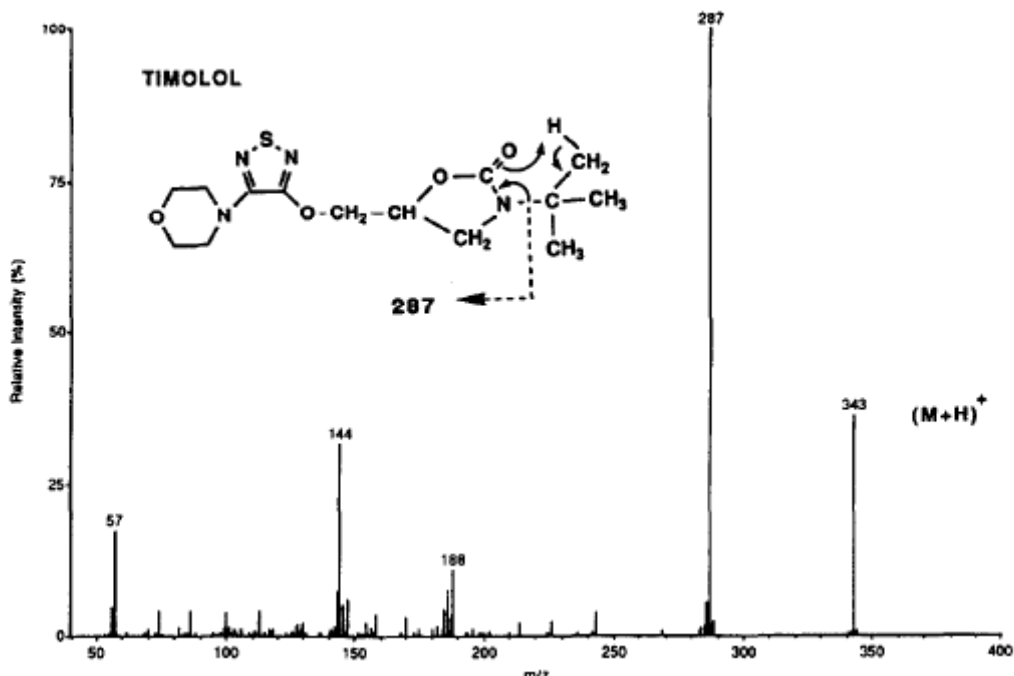
### 4.2.3.2 Massespektrometri

## Prinsipp

Massespektrometri (MS) er i likhet med NMR spektroskopi en strukturoppklaringsmetode. Denne metoden bestemmer den molekylære massen til en forbindelse og gir oss informasjon om fragmenteringsmønsteret, noe som kan bidra til å oppklare struktur og substitusjonsmønster.

MS utføres ved at forbindelsen som ønskes analysert ioniseres i et massespektrometer, det dannes dermed molekyllioner. Molekyllionene er vanligvis ustabile og vil raskt spaltes i mindre fragmenter, noen av disse fragmentene vil fortsatt være ioniserte. Massen  $M$  til molekyllioner og fragmentioner bestemmes deretter ved at ionene akselereres ut av ionekilden hvor ioniseringen har foregått og inn i en masseanalysator. I denne separeres ionene etter forholdet mellom masse og ladning enten i et magnetisk eller elektrostatisk felt. Siden ladning i de aller fleste tilfeller er lik en vil det i praksis være forskjellen i masse som separerer ionene. Lette ioner vil bøyes av kraftig, mens tyngre ioner vil bøyes av i noe mindre grad. Ionene detekteres etter analysatoren ved hjelp av en detektor, som registrerer mengden av ioner som dannes og hvilke masser disse ionene har ( $m/z$ ). Resultatet fra en massespektrometrisk analyse registreres i et massespektrum, hvor intensiteten av ioner plottes i et stolpediagram som funksjon av massen, se Figur 1 s.27. Hvor nøyaktig massen som angis i spektrumet er avhenger av oppløseligheten til instrumentet som brukes, massespektrometer med høy oppløselighet gir nøyaktige masser med 3-4 desimaler, massespektrometer med lav oppløselighet gir nominelle masser.





**Figur 1:** Massespektrum for timolol

I massespekteret vil isotopeffekter gjøre seg gjeldende, dette betyr at det oppstår signaler ved masseenheter høyere og lavere enn hovedmassesignalet til den aktuelle forbindelsen på grunn av molekyler inneholdende isotoper. Dette har vi for eksempel for forbindelser som inneholder karbon, noen av molekylene vil ikke bare inneholde  $^{12}\text{C}$ -atomer men også  $^{13}\text{C}$ -atomer. Andre vanlige isotoper som gir denne effekten er blant annet  $^{37}\text{Cl}$  og  $^{81}\text{Br}$ . Siden det er et bestemt forhold mellom mengden av de ulike isotopene til et atom kan dette brukes i tolkningen av massespekteret, både til å gjenkjenne hvilke atomer som er tilstede i forbindelsen og hvilket antall de er tilstede i. (Pedersen-Bjergaard 2005).

Ionisasjonen av molekyler kan gjøres på ulike måter, to vanlige metoder er elektronionisasjon og kjemisk ionisasjon. Elektronionisasjon er den vanligste teknikken og utføres ved at stoffet som skal analyseres føres inn i en stråle med elektroner, elektronene er akselerert slik at de har en energi på 70 eV. Det vil da i noen tilfeller rives løs et elektron i molekylet som følge av elektrisk frastøtning, dette gjør at molekylet får en positiv ladning. De fleste molekyllioner som dannes ved elektronionisasjon er relativt ustabile og vil raskt fragmentere og danne fragmentioner. Disse fragmentionene kan også fragmenteres videre. Ved elektronionisasjon ser vi derfor ofte bare fragmentionene og ikke molekyllionet i massespekteret. Den andre typen ionisering som kan utføres

på molekylene kalles kjemisk ionisering. Dette er en ioniseringstype med mindre energi som kan anvendes til å bestemme massen til et molekyl. En reagensgass innføres i ionekilden i relativt store mengder i forhold til stoffprøven og elektronene som frigis i ionekilden vil da nesten utelukkende ionisere reagensgassen. Reagensgassionene som dannes vil deretter ionisere molekylene i stoffprøven. Dette kan skje enten ved protonoverføring, dette gir massen  $M+1$ , eller ved hydridoverføring som gir massen  $M-1$ . Molekylionene som dannes ved kjemisk ionisasjon er vanligvis relativt stabile og vil gi dominerende signal i massespekteret. (Pedersen-Bjergaard 2005)

Ved massespektrometisk analyse er det vanlig å innføre prøven enten direkte ved hjelp av en probe eller via en kromatografisk kolonne hvor det i forveien har foregått en separasjon av prøvekomponenter. Rene prøver kan innføres direkte, mens mer komplekse prøver er vanlig å separere først ved hjelp av gass- eller væskerkromatografi. Prøvene innføres da direkte fra kromatografen etter hvert som de etter separasjon kommer ut av denne. Er massespektrometeret koblet med en HPLC kalles metoden LC/MS. Ioniseringsmetodene som benyttes da er vanligvis enten APESI (Atmospheric Pressure Electro Spray Ionisation) eller APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation). Disse metodene baserer seg på samme prinsipp som elektron- og kjemisk ionisasjon beskrevet over. Ved APESI er det lagt en spenningsforskjell over utgangen av HPLC apparatet og inngangen til MS apparatet, denne gir ionisering av lett ioniserbare substanser. Prøvene som kommer fra HPLC blandes med en nebuliserende gass og det dannes dermed ioniserte dråper, som etter hvert fordampes og det er igjen de-solvatiserte ioner som introduseres i MS apparatet og analyseres. Ved APCI blir prøvesubstansene ionisert ved hjelp av en coronanål. Prøven som kommer fra HPLC blir varmet kraftig opp og blir omdannet til små dråper ved spraydannelse. Dråpene fordampes og ioniseres av coronanålen, det er kun de-solvatiserte ioner som går inn i MS apparatet og analyseres, massen som blir målt er  $M+1$ . APCI er en mer voldsom ioniseringsmetode enn APESI, men begge metoder gir generelt lite fragmentering. (Reubsaet 2006)

### Utførelse

Massespektrometrisk analyse av de kjente isolerte forbindelsene ble utført på et LC/MS-apparat. En liten prøve av fraksjonen ble løst i metanol, og ble eluert på en omvendtfase analytisk HPLC kolonne med metanol-vann som mobilfase før innføring direkte fra HPLC kolonnen til MS-

apparatet. Den isolerte ukjente forbindelsen ble massespektrometrisk analysert på Kjemisk institutt, Universitet i Oslo, på et MS-apparat.

## Reagenser

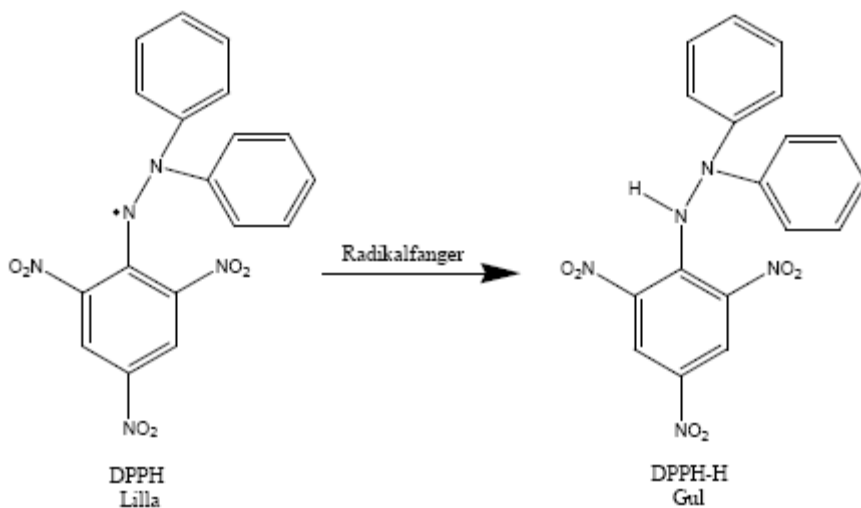
Metanol ble brukt som løsningsmiddel, og mobilfase var ulike blandingsforhold av metanol og destillert vann ved LC/MS-analysene.

## 4.2.4 Metoder for måling av biologisk aktivitet

### 4.2.4.1 DPPH-scavenging

#### Prinsipp

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) er et stabilt fritt radikal som har sterk absorbans ved 517 nm, og i løsning har det mørk fiolett farge. Ved reaksjon med en radikalscavenger vil det uparrede elektronet bli paret og dette gjør at absorbansen forsvinner og fargen går fra fiolett til gul, se Figur 2. (Blois 1958).



**Figur 2:** Omdanning av DPPH til DPPH-H ved hjelp av radikalfanger

Dette kan utnyttes til å sjekke om en substans/prøve har radikalscavenger aktivitet ved å måle absorbans ved 517 nm før og etter tilsetning av prøven til DPPH. Har prøven radikalscavenger

aktivitet vil vi se en nedgang i absorbans. Nedgangen i absorbans er relatert til mengde og potens av radikalscavengeren. Hvor mange prosent radikalscavenging en prøve gir kan regnes ut ved hjelp av formelen:

$$100 \times (A_o - A_t) / (A_o - A_p)$$

der  $A_o$  er startabsorbans (korrigert for egenabsorbans av testsubstans og fortynning),  $A_t$  er sluttabsorbans etter reaksjon med testsubstans og  $A_p$  er egenabsorbans av sluttproduktet diphenylpicrylhydrazin (Malterud 2007).

En ulempe med denne metoden er at DPPH er nokså forskjellig fra fysiologisk relevante radikaler.

#### Utførelse

Prøvene som skulle testes ble løst i dimetylsulfoksid (DMSO) i ønsket konsentrasjon.

Spektrofotometeret ble nullstilt med en blindprøve bestående av metanol. DPPH ble løst i metanol slik at løsnings absorbans ved 517 nm var 1,0. Startabsorbans ble målt i 2,95 ml DPPH-løsning før tilsetning av prøve ved 517 nm. Prøveløsningen (50 µl) ble deretter tilsatt og løsningen omrørt med plastspatel. Registrering av absorbans startet 30 sekunder etter tilsetning av prøve, og ble så målt hvert 60. sekund i fem minutter. Tre paralleller av hver prøve ble analysert.

#### Reagenser

DMSO til prøveløsningene og metanol til blindprøve og DPPH-løsning.

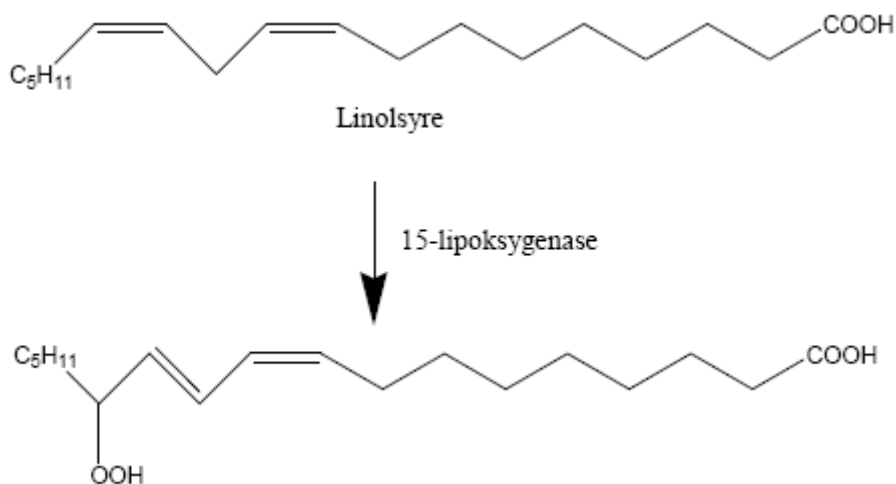
#### 4.2.4.2 15-Lipoksygenasehemming

##### Prinsipp

15-lipoksygenase (15-LO) er et av enzymene i arakidonsyremetabolismen og gir dannelsen av 15-hydroperoksyekosetetraensyre med arakidonsyre som substrat og 13-hydroperoksyoktadekadiensyre med linolsyre som substrat, se Figur 3 s.31. Arakidonsyremetabolitter som prostaglandiner og leukotriener har en sentral rolle i inflammatoriske prosesser og mange andre patologiske og fysiologiske prosesser. Det har vært foreslått at 15-LO kan ha en rolle i oksideringen av LDL og

dermed de aterosklerotiske prosesser, og det kan derfor være interessant å se om ulike substanser/prøver har evnen til å hemme dannelsen av disse metabolittene. Denne metoden er også en testmetode for enzymatisk lipidperoksidering siden 15-LO katalyserer peroksidering av flerumettede fettsyrer.

Konjugerte dobbeltbindinger som dannes i fettsyren etter reaksjon med 15-LO absorberer ved 234 nm. Absorbansen vil øke proporsjonalt med konsentrasjonen av dannet produkt, og man kan dermed måle hemming av 15-LO ved å måle hvor mye absorbansøkningen reduseres i forhold til en blankprøve ved tilsetning av testsubstans.



**Figur 3:** Peroksidering av linolsyre ved 15-LO

Linolsyre brukes som substrat i dette forsøket i stedet for arakidonsyre. Linolsyre og arakidonsyre som substrat gir noenlunde like verdier for enzymhemming, og linolsyre er betraktelig mye rimeligere enn arakidonsyre (Malterud 2003). Enzym fra soyabønner benyttes i stedet for mammalsk enzym av samme grunn og også fordi hemmingsresultater med soyabønneenzymet og mammalsk 15-LO er godt korrelert (Lyckander og Malterud 1996). Prosent enzymhemming kan regnes ut ved hjelp av formelen:

$$100 \times (A_2 - A_1) / A_2$$

der  $A_1$  og  $A_2$  er absorbansøkning per tidsenhet med og uten testsubstans tilsatt.

## Utførelse

Alle løsninger til analysen ble oppbevart ved romtemperatur, unntatt enzymløsningen som ble oppbevart på is for å hindre denaturering. Prøvene ble løst i DMSO til ønsket konsentrasjon. Løsning bestående av boratbuffer, substratløsning og DMSO ble brukt som blankprøve. Enzymløsningen ble innstilt slik at den ga en lineær absorbansøkning på ca 0,4 AU/min med blindprøve. Viser kurven utflating må løsningen fortynnes fordi det da ikke er nok substrat i forhold til mengde enzym.

Testløsningen bestod av boratbuffer, substratløsning, enzymløsning og DMSO

(blindprøve)/prøveløsning. Blindprøver ble testet til å begynne med og etter hver 3. prøveløsning for å sjekke at enzymaktiviteten holdt seg stabil. Absorbansmålingen ble startet 30 sekunder etter tilsetning av enzymløsning og omrøring, og målt i 60 sekunder. Hver prøve ble analysert i tre paralleller.

## Reagenser

Boratbuffer: 0,2M, pH=9, laget av borsyre og natriumhydroksid

Substratløsning: 50 µl linolsyre og 150 µl etanol blandes og tilsettes boratbuffer til 50 ml. 15 ml av denne løsningen fortynnes med 225 ml boratbuffer. Løsningen ble laget rett før forsøket.

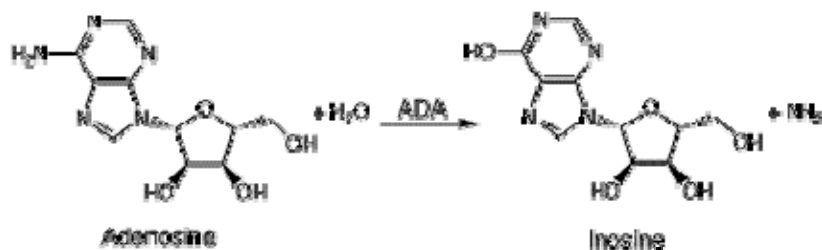
Enzymløsning: Lipoxidase enzym løses i boratbuffer. Løsningen ble laget rett før bruk og ble oppbevart på is under hele forsøket.

DMSO til løsning av prøvene og blind- og blankprøve.

### 4.2.4.3 Adenosin deaminase (ADA) hemming

## Prinsipp

ADA er et enzym som katalyserer omdannelsen av adenosin til inosin, se Figur 4 s.33. Hemming av denne reaksjonen er interessant å teste for fordi nyere forskning kan tyde på at ADA er involvert i ulike patologiske tilstander. Noen former for leukemi er assosiert med økt ADA aktivitet, vi ser også økt aktivitet ved psoriasis og noen antivirale og antitumormedisiner inaktiveres av ADA. Det har i den senere tid blitt foreslått at ADA-hemmere kan beskytte mot myokardial iskemi/reperfusjonsskade, det finnes noe bevis for dette fra dyrestudier. (Malterud 2006)



**Figur 4:** Omdanning av adenosine til inosine ved ADA

Adenosin absorberer UV-lys ved 265 nm, mens inosin ikke har denne absorbansen, enzymhemmingsaktivitet kan dermed måles ved å se på reduksjon av nedgang i absorbans ved tilsetning av testsubstans til en løsning der enzym og substrat er tilstede. Ved testing må enzymet inkuberes med testløsning før substrat tilsettes (Malterud 2006). Vi kan bruke følgende formel for å regne ut prosent enzymhemming:

$$100 \times (A_2 - A_1) / A_2$$

hvor  $A_1$  og  $A_2$  er absorbansreduksjon per tidsenhet med og uten testsubstans tilsatt.

#### Utførelse

Alle prøver som skulle analyseres ble løst i DMSO til ønsket konsentrasjon. Kyvettebeholderen på UV-apparatet ble stilt inn til å holde 30°C under hele forsøket. Som blindprøve ble det brukt en løsning av fosfatbuffer tilsatt bovint serumalbumin (BSA), DMSO og substratløsning. Testløsningene bestod av fosfatbuffer m/BSA, prøveløsning eller DMSO (blankprøve), enzymløsning og substratløsning. Alt utenom substratløsningen ble blandet i en kyvette og satt i UV-apparatet, der stod det til inkubering ved 30°C i fem minutter før substratløsningen ble tilsatt. 30 sekunder etter substratløsningen ble tilsatt ble det startet absorbansmåling ved 265 nm, nedgang i absorbansen ved denne bølgelengden ble målt over en periode på fire minutter. Hver prøve ble analysert i tre paralleller og til og begynne med og etter hver tredje prøve ble det analysert blankprøver.

## Reagenser

Fosfatbuffer 50 mM, pH=7,0 med 1 mg/ml BSA, ADA 0,083 U/ml i fosfatbuffer m/BSA, Adenosine 0,01 mg/ml i fosfatbuffer m/BSA, DMSO. Alle løsningene ble tillaget rett før bruk.

### 4.2.4.4 Toksisitetsassay (*Brine shrimp lethality assay*)

#### Prinsipp

Mange bioaktive stoffer vil være toksiske for Brine Shrimp (rekelarver). Dermed kan en in vivo test på rekelarve letalitet brukes som en rask og enkel innledende toksisitetstest ved isolering av naturstoffer.

Testen går ut på at testløsning og nyutklekkede rekelarver blandes i et reagensrør med saltvann (artifisielt sjøvann) som er rekelarvenes naturlige miljø. Etter 24 timers henstand ser man på løsningen og teller hvor mange av de opprinnelige rekelarvene som har overlevd. Man kan dermed på en enkel måte regne ut  $LC_{50}$  verdien til et stoff. Dette er konsentrasjonen som gir 50 % dødelighet.

#### Utførelse

Rekelarveegg ble lagt i en beholder med saltvann for utklekking. Beholderen bør ha en del som er beskyttet mot lys og en som er lysutsatt, disse to delene bør være atskilt, men med en liten åpning mellom. Dette er fordi ferdig klekkede rekelarver tiltrekkes av lys og vil bevege seg ut i delen som er lysutsatt, og kan dermed lett plukkes derfra. Rekelarveeggene klekket i løpet av 48 timer ved romtemperatur.

Prøvene som skulle testes løses til ønsket konsentrasjon i DMSO, hver konsentrasjon ble testet i tre paralleller. Totalvolumet av DMSO i hver testløsning kan ikke overstige 50 µl, tilsetning av større volum vil påvirke resultatet. Hver testløsning ble overført til et reagensrør og tilsatt saltvann til 4,5 ml. Ferdig klekkede rekelarvene ble talt ut, ti rekelarver til hvert reagensrør, og så tilsattes saltvann opptil 5 ml. Reagensrørene ble satt til henstand i 24 timer under lys ved romtemperatur. Etter 24 timer ble antall overlevende rekelarver per reagensrør talt, dette gjøres enklest under lampe med



forstørrelsesglass. Basert på resultatverdiene kunne  $LC_{50}$  verdier for de ulike stoffene som ble testet regnes ut.

Reagenser

Rekelarveegg

Saltvann: 16,5 g Aqua-Biosal, kunstig havsaltblanding, løses i 500 ml destillert vann

DMSO

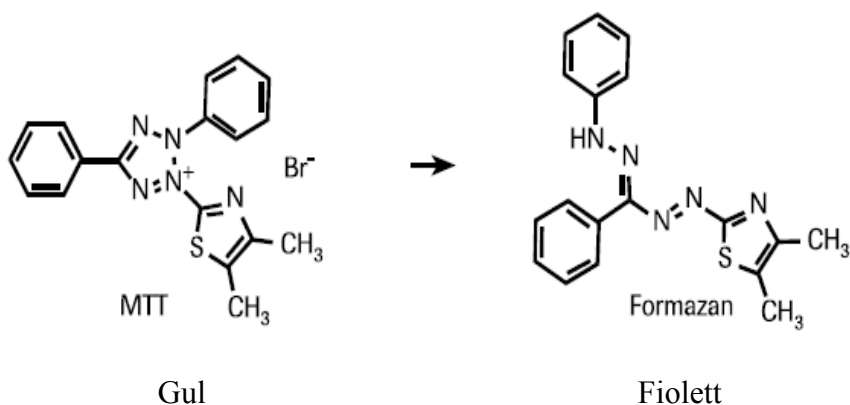
#### 4.2.4.5 *Antifungal test*

Prinsipp

Etter hvert som man har sett en økende forekomst av opportunistiske systemiske soppsykdommer har det blitt mer fokus på søk etter antifungale substanser. I den forbindelse er det viktig å kunne teste renstoffer så vel som mer komplekse prøver for antifungal aktivitet. Her presenteres en metode som muliggjør testing av ikke fullt opprensede prøver av plantemateriale. På den måten kan man finne ut hvilke fraksjoner fra en planteprøve som er interessante å jobbe videre med i jakten på antifungale komponenter.

Metoden baserer seg på en TLC bioautografisk metode beskrevet av Rahalison et al. (1991). Denne metoden går ut på at prøvene som man vil undersøke for antifungal aktivitet kromatograferes på en TLC plate av glass med egnet mobilfase. Etter at platen er ferdig utviklet og tørket sprer man en flytende agar i tynt lag (ca 1mm) utover TLC platen. Agaren er på dette tidspunktet tilsatt sopp i vekst og må være et egnet medium for den aktuelle type sopp. Etter at agaren er spredd utover og stivnet settes TLC platen til inkubering i et fuktig miljø over natten. Dagen etter sprayes TLC platen med en vandig løsning av methylthiazolyltetrazolium (MTT). TLC platen inkuberes så igjen i fire timer, etter dette tas den ut og man stopper soppvekst med spraying med etanol. MTT er et stoff som vil spaltes og bli redusert av enzymer i mitokondrier hos metabolsk aktive celler til den fiolette substansen MTT-formazan, se Figur 5 s.36. Etter spraying med MTT og inkubering vil dermed soner der det fantes stoff som har antifungal aktivitet fremstå som klare soner på fiolett bakgrunn. Det ble gjort visse små modifikasjoner ved metoden, som at soppen ikke ble inkubert en viss tid i den

flytende agaren før den ble spredd utover TLC platen og at mengde mikroorganismer som ble tilsatt agaren ikke ble optisk målt.



**Figur 5:** Spalting av MTT til MTT-formazan

#### Utførelse

Dag 1:

- Fryst *Candida albicans* på culti-loop sås ut på en petriskål støpt med Sabouraud medium, denne inkuberes i 48 timer ved 37°C

Dag 2:

- Fysiologisk saltvann, sterilfiltrert tilberedes
- Mc Farland standard 0,5 tilberedes

Begge oppbevares i kjøleskap til neste dag

Dag 3:

- 200-300 µg av hver prøve løst i flyktig løsningsmiddel, appliseres på en silika TLC plate i glass
- Sulconazol brukes som positiv kontroll i forsøket og ca 20 µg av denne løst i metanol appliseres også på TLC platen
- Det lages en referanseplate i aluminium med tilsvarende prøver
- TLC platene utvikles med egnet mobilfase
- Etter endt utvikling tørkes platen slik at alt løsningsmiddel er fjernet
- Referanseplaten fremkalles på vanlig måte med Ceric sprayreagens

- Maltagar tilberedes og oppbevares på vannbad som holder 45°C frem til bruk. Maltagaren stivner ved 43°C, og soppen dør ved 48°C
- *Candida albicans* kolonier fra den inkuberte skålen fra dag 1 tilsettes et reagensrør med 5 ml fysiologisk saltvann til blakketheten tilsvarer Mc Farland standard 0,5, dette tilsvarer ca  $10^7$ - $10^8$  CFU/ml
- Denne løsningen tilsettes maltagaren og omrøres
- TLC platen som er ferdig eluert varmes til ca 35°C for å hindre at agaren stivner for raskt når den påføres
- Maltagar tilsatt sopp appliseres på TLC platen i tynt lag med pipette, ca 20 ml til en 20 x 20 cm plate
- Når maltagaren har stivnet settes TLC platen til inkubering over natten ved 37°C grader i et fuktbevarende miljø. Vi benyttet et kar som kunne lukkes med fuktete filterpapir lagt i bunn

Dag 4:

- TLC platen sprayes med MTT, og inkuberes deretter i ytterligere 4 timer ved 37°C
- TLC platen tas ut av inkuberingskaret og sprayes med etanol for å stanse soppveksten, deretter lufttørkes den og avfotograferes
- Hemmingssoner fremstår som fargeløse soner på fiolett bakgrunn

Reagenser

Petriskål med 2 % Sabouraud medium

Fysiologisk saltvann: 0,9 g NaCl løst i 100 ml destillert vann

Mc Farland standard 0,5: 0,5 ml bariumklorid 0,048 M og 99,5 ml svovelsyre 0,18 M

Maltagar: 2,4 g maltekstrakt løst i 50 ml destillert vann

Vandig løsning av MTT, 2,5 mg/ml

Etanol

Ulike løsningsmidler til løsning av prøvene og som elueringsmiddel, som for eksempel diklormetan, kloroform og etylacetat

Ceric sprayreagens

#### 4.2.4.6 Antibakteriell test

##### Prinsipp

Mange ulike medisinerplanter blir benyttet i behandlingen av infeksjonssykdommer. For å sjekke om disse plantene vil kunne ha helbredende effekt ved bakterielle infeksjonssykdommer må man teste om substanser / fraksjoner fra planten har antibakteriell effekt.

Denne testen følger samme prinsipp som den antifungale testen og tar også utgangspunkt i den TLC bioautografiske metoden beskrevet av Rahalison et al. (1991). For mer detaljer angående denne metoden, se over. Forskjellen er at man i denne testen benytter seg av bakterier og ikke sopp. Det ble også her gjort de samme modifikasjoner ved metoden som i den antifungale testen, se punkt 4.2.4.5.

##### Utførelse

##### Dag 1:

- Fryst *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Pseudomonas aeruginosa* på culti-loop sås ut på petriskåler støpt med Müller Hinton medium, disse inkuberes i 24 timer ved 37°C

##### Dag 2:

- Fysiologisk saltvann, sterilfiltrert tilberedes
- Mc Farland standard 0,5 tilberedes
- 200-300 µg av hver prøve løst i flyktig løsningsmiddel appliseres på silika TLC plater i glass
- Gentamicin brukes som positiv kontroll i forsøket og ca 20 µg av denne løst i destillert vann appliseres også på TLC platene
- Det lages en referanseplate i aluminium med tilsvarende prøver
- TLC platene elueres med egnet elueringsmiddel
- Etter endt eluering tørkes platene til alt løsningsmiddel er fjernet
- Referanseplaten fremkalles på vanlig måte med Ceric sprayreagens
- 3 beholdere med 30 ml LB agar oppbevares på vannbad, ca 45°C, frem til bruk for å holde agaren flytende

- Bakteriekolonier fra de inkuberte skålene fra dag 1 tilsettes til 3 reagensrør med 3 ml fysiologisk saltvann til blakketheten tilsvarer Mc Farland standard 0,5, dette tilsvarer ca  $10^7$ - $10^8$  CFU/ml, en type bakterie i hvert rør
- Saltvannsløsningene tilsettes LB agar beholderne, som er noe avkjølt, en løsning til hver beholder, og omrøres
- TLC platene som er ferdig eluert varmes til ca 35°C for å hindre at agaren stivner for raskt når den påføres
- LB agar tilsatt bakterier appliseres på TLC platene i tynt lag med pipette, ca 20 ml til en 20 x 20 cm plate, kun en type bakterie på hver TLC plate
- Når LB agaren har stivnet settes TLC platene til inkubering over natten ved 37°C grader i et fuktbevarende miljø. Vi benyttet et kar som kunne lukkes, med fuktete filterpapir lagt i bunn

Dag 3:

- TLC platene sprayes med MTT, og inkuberes deretter i ytterligere 4 timer ved 37°C
- TLC platene tas ut av inkuberingskaret og sprayes med etanol for å stanse bakterieveksten, deretter lufttørkes de og avfotograferes
- Hemmingssoner fremstår som fargeløse soner på fiolett bakgrunn

Reagenser

*E. coli*, *P. aeruginosa* og *S. aureus* culti-loops

Petriskåler med Müller Hinton medium

Fysiologisk saltvann: 0,9 g NaCl løst i 100 ml destillert vann

Mc Farland standard 0,5: 0,5 ml bariumklorid 0,048 M og 99,5 ml svovelsyre 0,18 M

LB agar

Vandig løsning av MTT, 2,5 mg/ml

Etanol

Ulike løsningsmidler, som for eksempel diklormetan, kloroform og etylacetat

Ceric sprayreagens

## 4.3 Eksperimentell utførelse

### 4.3.1 Utgangsmateriale

Utgangsmaterialet som ble benyttet var metanol- og diklormetanrækstrakt av *Erythrina senegalensis* rotbark fremstilt av Annette Theis våren 2006 i forbindelse med hennes oppgave ”*Erythrina senegalensis* – En medisinsplante fra Mali. Undersøkelse av antifungale komponenter” (Theis 2006). Ekstraktet er fremstilt av *Erythrina senegalensis* plantemateriale innsamlet i Blendio, Mali april 2005.

#### *Analytisk TLC*

For å avgjøre hvilken mobilfase som ville egne seg best ved kolonneseparasjon av de to rækstraktene ble de testet med ulike mobilfaser på TLC plater. Metanolrækstraktet er et polart ekstrakt og ble testet på omvendtfase TLC plater. Diklormetanrækstraktet er et upolart ekstrakt og ble testet på normalfase silika TLC plater. Følgende mobilfaser ble testet:

Metanolrækstraktet: metanol-vann (1:1), metanol-vann (3:1) og metanol.

Diklormetanrækstraktet: diklormetan, etylacetat, kloroform, kloroform-etylacetat (60:1) og kloroform-etylacetat (9:1).

#### *Bioassay*

Assay for radikalscavenging (DPPH-test) ble utført på metanol- og diklormetanrækstraktene.

Ekstraktene ble testet ved konsentrasjonen 83 µg/ml. Resultater av samtlige bioassayforsøk er gitt i Tabell 15-18 s.61-62 og Vedlegg 32 s.142.

Test for 15-lipoksygenase hemming ble utført på diklormetanrækstraktet ved konsentrasjonene 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml og 12,5 µg/ml.

Adenosin deaminase (ADA) hemmingstest ble utført på diklormetanrækstraktet ved konsentrasjonene 100 µg/ml og 50 µg/ml.

Toksisitetsassay (Brine-Shrimp lethality assay) ble utført på diklormetanrækstraktet ved konsentrasjonene 100 µg/ml og 50 µg/ml.

Antifungal test (*Candida albicans*) og antibakteriell test (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Pseudomonas aeruginosa*) ble utført på diklormetanrækstraktet. Som løsningsmiddel ble det benyttet diklormetan.

#### 4.3.2 Fraksjonering av metanolrækstraktet

##### *VersaFlash kolonneseparasjon*

Metanolrækstraktet, 7,1011 g, ble løst i 20 ml metanol – vann (1:1). Dette løste ikke ekstraktet fullstendig og ytterligere 20 ml metanol ble tilsatt og blandingen ble satt på ultralydbad i 10 minutter. Prøven ble så dekantert og filtrert, klumpene som enda ikke hadde løst seg ble tørket og veid, slik at det kunne regnes ut nøyaktig hvor mye ekstrakt som var i prøven som ble benyttet videre.

Kolonnen som ble benyttet ved separasjonen var en C<sub>18</sub> kolonne, altså omvendtfase. Kolonnen ble kondisjonert med metanol-vann (1:1). Som mobilfase ble det brukt metanol-vann (1:1), metanol-vann (2:1), metanol-vann (3:1), metanol og aceton-vann (7:3), se Tabell 1. Analytisk TLC testing av metanolrækstraktet hadde vist at det var disse løsningsmiddelblandingene som separerte komponentene i ekstraktet best. Det ble samlet 63 fraksjoner.

Fraksjon	Mobilfase
0 – 10	Metanol-vann (1:1)
10 – 23	Metanol-vann (2:1)
23 – 41	Metanol-vann (3:1)
41 – 57	Metanol
57 – 63	Aceton-vann (7:3)

**Tabell 1:** Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av metanolrækstrakt  
Fraksjonsvolum:

Fraksjon 0 = 50+ ml

Fraksjon 1 – 63 = 20 ml

##### *Analytisk TLC*

For å bestemme hvilke fraksjoner som kunne slås sammen, dvs. hvilke som inneholdt de samme komponentene, ble alle fraksjonene applisert på omvendt fase TLC plater. Disse ble utviklet med

mobilfasene metanol-vann (2:1), metanol-vann (3:1) og metanol. Platene ble etter endt utvikling og tørking betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. Ut fra betraktning av TLC platene ble fraksjonene slått sammen, se Tabell 2.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1	M-1
2 – 3	M-2
4 – 5	M-3
6 – 13	M-4
14 – 17	M-5
18 – 26	M-6
27 – 29	M-7
30 – 35	M-8
36 – 46	M-9
47 – 50	M-10
51 – 63	M-11

**Tabell 2:** Sammenslåing av metanolrækstrakt fraksjoner

### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene fra metanolrækstraktet ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard.

### *Bioassay*

Fraksjon M-1 – M-11, dvs. alle fraksjonene, fra metanolrækstraktet ble testet for radikalscavenging (DPPH - test). De ble testet i konsentrasjonen 83  $\mu\text{g/ml}$ . Resultatene er gitt i Tabell 20 s.64.

### **4.3.3 Fraksjonering av diklormetanrækstraktet**

Flytskjema for fraksjoneringen av diklormetanrækstraktet og videre arbeid med fraksjonene er vist i vedleggsdelen av hovedfagsoppgaven, Flytskjema 1-5 s.119-123.

### *VersaFlash kolonne separasjon*

Diklormetanrækstraktet, 7,0345 g, ble løst i 20 ml diklormetan. For at det skulle løse seg mest mulig ble blandingen satt på ultralydbad i 10 minutter. Løsningen ble deretter dekantert og filtrert, klumpene som enda ikke hadde løst seg ble tørket og veid, slik at det kunne regnes ut nøyaktig hvor mye ekstrakt som var i prøven som ble benyttet videre.



Ved kolonneseparasjonen ble det benyttet en silikakolonne, altså normalfase separasjon. Kolonnen ble kondisjonert med diklormetan. Som mobilfase ble det benyttet diklormetan, kloroform, kloroform-etylacetat (9:1), kloroform-etylacetat (4:1), etylacetat og aceton, se Tabell 3. Analytisk TLC testing av diklormetanrækstraktet hadde vist at det var disse løsningsmiddelblandingene som separerte komponentene i ekstraktet best. Det ble i alt samlet 108 fraksjoner.

Fraksjon	Mobilfase
0 – 10	Diklormetan
11 – 16	Kloroform
17 – 50	Kloroform-etylacetat (9:1)
51 – 69	Kloroform-etylacetat (4:1)
70 – 90	Etylacetat
91 – 108	Aceton

**Tabell 3:** Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av diklormetanrækstraktet  
Fraksjonsvolum:

Fraksjon 0 = 80 ml

Fraksjon 1 – 108 = 20 ml

### *Analytisk TLC*

Alle fraksjonene ble applisert på normal fase silika TLC plater for å se hvilke fraksjoner som kunne slås sammen, dvs. hvilke fraksjoner som inneholdt samme komponenter. TLC platene ble utviklet med mobilfasene diklormetan, kloroform-etylacetat (60:1), kloroform-etylacetat (19:1), kloroform-etylacetat (9:1) m/ 1 % eddiksyre, kloroform-etylacetat (3:1) m/ 1 % eddiksyre, kloroform-etylacetat (1:1) m/ 1 % eddiksyre og etylacetat m/ 1 % eddiksyre. Etter endt utvikling og tørking ble platene betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. Etter å ha sett på TLC platene kunne fraksjonene slås sammen, se Tabell 4 s.44.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 5	1
6 – 8	2
9 – 10	3
11	4
12 – 13	5
14 – 25	6
26 – 27	7
28 – 29	8
30	9
31 – 36	10
37 – 41	11
42 – 43	12
44 – 47	13
48 – 57	14
58 – 61	15
62 – 71	16
72 – 76	17
77 – 79	18
80 – 82	19
83 – 97	20
98 – 101	21
102 – 108	22

**Tabell 4:** Sammenslåing av diklormetanrækstrakt fraksjoner

### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Fraksjon 11 og 18 ble også analysert ved hjelp av  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS til fraksjon 1 – 15 og deuterert aceton tilsatt TMS til fraksjon 16 – 22. Spektrene til fraksjonene som det i ettertid ble arbeidet videre med er gjengitt i Vedlegg 3-6 s.125-126.

### *Bioassay*

Assay for radikalscavenging (DPPH – test) ble utført på alle fraksjonene fra diklormetanrækstraktet. Fraksjonene ble testet ved konsentrasjonen 83  $\mu\text{g/ml}$ . Fraksjon 8 og 11 ble også testet ved konsentrasjonene 41,5 og 20,8  $\mu\text{g/ml}$ . Resultatene er gitt i Tabell 21 s.66.

#### 4.3.4 Videre separasjon av fraksjon 6

##### *VersaFlash kolonne separasjon med UV-detektor*

Fraksjon 6 ble løst i litt diklormetan og metanol og applisert direkte på kolonnen. Kolonnen som ble benyttet var en C<sub>18</sub> kolonne. Mobilfaser var ulike blandingsforhold av metanol-vann, det ble benyttet gradient eluering og startet med metanol-vann (1:3) for så å øke metanolandelen, se

Tabell 5.

Mobilfase	Volum
Metanol-vann (1:3)	200 ml
Metanol-vann (3:2)	200 ml
Metanol-vann (3:1)	200 ml
Metanol-vann (17:3)	200 ml
Metanol-vann (9:1)	200 ml
Metanol-vann (19:1)	200 ml
Metanol	300 ml
Aceton	200 ml

**Tabell 5:** Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon 6  
Fraksjonsvolum= ca. 15 ml

Fraksjonene ble samlet inn med en fraksjonssamler og ut ifra absorbanstopper i kromatogrammet ble de slått sammen, dvs. fraksjoner i samme topp ble samlet til en fraksjon, se Tabell 6.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 68	6.1
69 – 78	6.2
79 – 89	6.3
90 – 94	6.4
95 – 100	6.5
101 – 106	6.6
107 – 114	6.7
115 – 121	6.8

**Tabell 6:** Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av 6

##### *NMR spektroskopi*

Fraksjonene 6.2, 6.3, 6.4, 6.5 og 6.8 ble analysert ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det benyttet deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard.

#### 4.3.5 Videre arbeid med fraksjon 6.2 og 6.3

##### *Sammenslåing*

Fraksjon 6.2 og 6.3 så ut til å inneholde de samme forbindelsene etter sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR spektra og ble derfor slått sammen.

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 6.2+3 ble løst i litt diklormetan og metanol og applisert på kolonnen, kolonnen var en  $\text{C}_{18}$  preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt metanol-vann (17:3) isokratisk. Ut ifra absorbanen ved 280 nm som vist i kromatogrammet ble det samlet inn fraksjoner. Det var kun en absorbanstopp og ble dermed bare en fraksjon, fraksjon 6.(2+3).1.

##### *NMR spektroskopi*

Fraksjon 6.(2+3).1 ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard benyttet.

#### 4.3.6 Videre separasjon av fraksjon 6.8

##### *VersaFlash kolonne separasjon*

Fraksjon 6.8 ble løst i kloroform og applisert på kolonnen, det ble benyttet en silikakolonne. To ulike mobilfaser ble brukt, se Tabell 7. Det ble i alt samlet inn 43 fraksjoner.

Mobilfase	Volum
Kloroform	200 ml
Kloroform-etylacetat (9:1)	300 ml

**Tabell 7:** Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av fraksjon 6.8

##### *Analytisk TLC*

For å slå fast hvilke fraksjoner som inneholdt de samme forbindelsene og dermed kunne slås sammen ble prøver fra alle fraksjonene applisert på normalfase silika TLC plater og utviklet med kloroform. Etter endt utvikling ble TLC platene tørket og sett på i kort- og langbølget UV-lys, og

deretter fremkalt med ceric reagens. Fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av TLC platene, se Tabell 8.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 14	6.8.1
15 – 25	6.8.2
26 – 30	6.8.3
31 – 33	6.8.4
34 – 43	6.8.5

**Tabell 8:** Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av 6.8

#### *NMR spektroskopi*

Fraksjon 6.8.2 og 6.8.4 ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard benyttet.

#### **4.3.7 Videre separasjon av fraksjon 6.8.4**

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 6.8.4 ble løst i litt diklormetan og metanol og deretter applisert på kolonnen, det ble benyttet en  $\text{C}_{18}$  preparativ HPLC kolonne. Det ble benyttet gradient kjøring og mobilfase var ulike blandingsforhold av metanol-vann, fra 85 % til 100 % metanol. Fraksjoner ble samlet på bakgrunn av absorbanstopper ved 280 nm i kromatogrammet, dette ga totalt 5 fraksjoner, fraksjon 6.8.4.1 – 6.8.4.5. Etter henstand over natten hadde det dannet seg krystallvekst i fraksjon 6.8.4.5, denne ble da delt i to, en del uten krystaller og en del med, endte dermed opp med 6 fraksjoner, fraksjon 6.8.4.1 – 6.8.4.6.

##### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene, 6.8.4.1 – 6.8.4.6, ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard.

### 4.3.8 Videre separasjon av fraksjon 7

#### *Sentrifugalt akselerert TLC*

Ferdig støpt silika TLC plate med gipstilsats ble kondisjonert med diklormetan. Fraksjon 7 ble løst i diklormetan og deretter applisert litt etter litt på kromatotronen. Som mobilfase ble det brukt diklormetan, diklormetan m/ 2 % aceton og aceton, se Tabell 9. Ved hjelp av UV-lampe kunne de ulike komponentene i fraksjonen sees og fraksjoner ble samlet på bakgrunn av dette. Det ble i alt samlet 16 fraksjoner.

Fraksjon	Mobilfase
1 – 6	Diklormetan
6 – 13	Diklormetan m/ 2 % aceton
13 – 16	Aceton

**Tabell 9:** Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av 7

#### *Analytisk TLC*

For å se hvilke fraksjoner som inneholdt samme komponenter og dermed kunne slås sammen ble prøver av alle fraksjonene applisert på normalfase silika TLC plater og utviklet med diklormetan som mobilfase. Etter endt utvikling ble platene tørket, betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. Ved å se på TLC platene etter fremkalling kunne fraksjonene slås sammen, se Tabell 10.

TLC fraksjon	Fraksjon
2 – 6	7.1
7 – 9	7.2
10 – 11	7.3
12 – 13	7.4
14	7.5
15 – 16	7.6

**Tabell 10:** Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av 7

#### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene, 7.1 – 7.6, ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard.

#### 4.3.9 Videre separasjon av fraksjon 7.1

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 7.1 ble videre separert på preparativ HPLC kolonne. Fraksjonen ble løst i diklormetan og applisert på kolonnen, en C<sub>18</sub> HPLC preparativ kolonne. Fra testing på analytisk HPLC kolonne var det klart at mobilfasen metanol-vann (3:1) egnet seg ved separasjon av fraksjoner som var fremstilt fra separasjon av fraksjon 7. Denne mobilfasen ble også benyttet i dette tilfellet. Ved å se på absorbanen som ble registrert i kromatogrammet ved 280 nm ble det samlet inn fraksjoner. Det ble samlet tre fraksjoner som viste absorbanstopp, fraksjon 7.1.1 – 7.1.3.

##### *NMR spektroskopi*

Fraksjon 7.1.1 – 7.1.3 ble analysert ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR spektroskopi, fraksjon 7.1.2 ble også analysert ved hjelp av <sup>13</sup>C NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det benyttet deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard. Spektrene er gjengitt i Vedlegg 7-8 s.127 og Vedlegg 10 s.128.

##### *Bioassay*

Fraksjon 7.1.2 ble testet for 15-lipoksygenase hemming ved konsentrasjonene 12,5 µg/ml og 25 µg/ml. Resultatene er gitt i Tabell 24 s.74.

Fraksjon 7.1.2 ble også antimikrobielt testet, dvs. antifungal- og antibakterielltest, se Vedlegg 32 s.142. Som løsningsmiddel ble det brukt diklormetan.

#### 4.3.10 Videre separasjon av fraksjon 7.2

##### *Analytisk TLC*

For å finne ut hvilken mobilfase som ville egne seg best, dvs. separere best, ved fraksjonering av fraksjon 7.2 ble prøver av denne applisert på normalfase silika TLC plater som ble utviklet med ulike mobilfaser. Mobilfasene som ble prøvd ut var heksan-etylacetat (19:1), heksan-etylacetat (4:1) og heksan-etylacetat (3:2). Etter endt utvikling ble platene tørket, betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens.

### *Preparativ TLC*

TLC platene som ble benyttet var glassplater dekket med silika, altså normalfase. Før prøvepåsetting ble platene utviklet med heksan-etylacetat (19:1) og deretter tørket, for å fjerne eventuelle forurensninger som kunne være i platen. Hele fraksjon 7.2 løst i diklormetan ble deretter applisert på platene. Prøvesonen ble oppkonsentrert med aceton. Aceton ble så dampet av og platene ble utviklet med heksan-etylacetat (17:3). Etter endt utvikling ble TLC platene tørket og ved hjelp av kort- og langbølget UV-lys ble sonene/fraksjonene med de ulike komponentene merket av. Disse ble skrapet av, blandet med aceton og silikagelen frafiltrert. I alt ble det samlet fem fraksjoner, fraksjon 7.2.1 – 7.2.5.

### *NMR spektroskopi*

Fraksjon 7.2.1, 7.2.3 og 7.2.4 ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Fraksjon 7.2.3 ble også analysert ved hjelp av  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard.

## **4.3.11 Videre separasjon av fraksjon 7.2.3**

### *Analytisk HPLC*

For å finne ut hvilken mobilfase som ville gi best separasjon av fraksjon 7.2.3 ved preparativ HPLC ble ulike mobilfaser testet ut ved hjelp av analytisk HPLC. En liten prøve av fraksjon 7.2.3 ble løst i litt diklormetan og metanol, denne ble så applisert på HPLC kolonnen. Kolonnen som ble benyttet var en  $\text{C}_{18}$  analytisk HPLC kolonne, og 80 %, 85 % og 90 % metanol i vann ble testet ut som mobilfaser.

### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 7.2.3 ble løst i litt diklormetan og metanol og applisert på en  $\text{C}_{18}$  preparativ HPLC kolonne. Mobilfasen som ble anvendt var 85 % metanol i vann og separasjonen ble foretatt isokratisk. Ved å se på absorbansen registrert i kromatogrammet ble det samlet fraksjoner. Det ble i alt samlet tre fraksjoner som viste absorbanstopp ved 280 nm på HPLC kromatogrammet, fraksjon 7.2.3.1 – 7.2.3.3.



*NMR spektroskopi*

De tre fraksjonene ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi, fraksjon 7.2.3.1 og 7.2.3.2 viste seg å inneholde samme forbindelse og ble dermed slått sammen. Denne fraksjonen ble så analysert ved hjelp av  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi. For alle spektrene se Vedlegg 11-14 s.129-130.

*Massespektrometri*

Fraksjonene 7.2.3.1 og 7.2.3.2 slått sammen ble analysert ved hjelp av massespektrometri. Analysen ble utført på et LC/MS apparat. Kolonnen som ble benyttet var en silika  $\text{C}_{18}$  analytisk HPLC kolonne og mobilfase var 85 % metanol. Ioniseringsmetoden som ble benyttet var APCI og massemålinger ble foretatt i positiv mode. Spekteret er gjengitt i Vedlegg 28 s.138.

*Bioassay*

Den sammenslåtte fraksjonen 7.2.3.1+2 ble testet for 15-lipoksygenase hemming ved konsentrasjonene 12,5  $\mu\text{g/ml}$  og 25  $\mu\text{g/ml}$ . Resultatene av testen er gitt i Tabell 27 s.79.

Fraksjon 7.2.3.1+2 ble også antimikrobielt testet, dvs. antifungal- og antibakterielltest, se Vedlegg 32 s.142. Som løsningsmiddel ble det brukt diklormetan.

**4.3.12 Videre arbeid med fraksjon 7.3***Analytisk TLC*

For å sjekke om fraksjon 7.3 inneholdt forbindelsen kumarsyre (parahydroksykaneltsyre) ble analytisk TLC benyttet. Fraksjon 7.3 og standardprøve av kumarsyre ble applisert på samme normalfase silika TLC plate og ble utviklet med etylacetat med 1 % eddiksyre som mobilfase. Etter endt utvikling ble platen tørket, betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens.

Analytisk TLC ble også benyttet for å finne egnet mobilfase til preparativ TLC av fraksjon 7.3. Mobilfasene som ble testet ut var etylacetat-heptan (9:1) og etylacetat-heptan (1:4), begge med 1 % eddiksyre.

*Preparativ TLC*

TLC platene som ble benyttet var glassplater dekket med silika, altså normalfase. Disse ble før prøvepåsetting utviklet med heptan-etylacetat (19:1) for å fjerne eventuelle forurensninger. Platene ble så tørket og fraksjon 7.3 ble applisert. Aceton ble brukt for å oppkonsentrere prøvesonen. Etter at platene igjen var tørre ble de utviklet med heptan-etylacetat (4:1) med 1 % eddiksyre. Etter endt utvikling ble platene tørket og ved hjelp av å se på dem i kort- og langbølget UV-lys ble de ulike stoffsonene avmerket. Disse ble samlet hver for seg og blandet med aceton, deretter ble de filtrert med sug. Det ble samlet totalt fire fraksjoner, fraksjon 7.3.1 – 7.3.4.

*NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det benyttet deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard.

**4.3.13 Videre separasjon av fraksjon 7.3.2***Analytisk HPLC*

For å finne den mobilfasen som egnet seg best til separasjon av fraksjonen på preparativ HPLC ble ulike mobilfaser testet ut på analytisk HPLC. En liten prøve av fraksjon 7.3.2 ble løst i litt diklormetan og metanol, denne ble så applisert på HPLC kolonnen. Kolonnen som ble benyttet var en  $\text{C}_{18}$  analytisk HPLC kolonne, og 80 %, 85 %, 90 % og 95 % metanol i vann ble testet ut som mobilfase.

*Preparativ HPLC*

Fraksjon 7.3.2 ble løst i litt diklormetan og metanol og ble deretter applisert på den preparative HPLC kolonnen. Det ble benyttet en omvendtfase kolonne ( $\text{C}_{18}$ ). Som mobilfase ble 85 % metanol i vann benyttet. Ut i fra absorbans ved 280 nm registrert i kromatogrammet ble fraksjoner samlet. Det ble samlet en fraksjon som viste absorbanstopp i kromatogrammet, fraksjon 7.3.2.1 og en som ikke viste noen topp i absorbansen, fraksjon 7.3.2.2.

*NMR spektroskopi*

Fraksjon 7.3.2.1 ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR og  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard.

**4.3.14 Videre separasjon av fraksjon 7.3.3***Analytisk HPLC*

For å bestemme en mobilfase som kunne brukes til separasjon av denne fraksjonen på preparativ HPLC ble ulike mobilfaser testet ut på analytisk HPLC. Det ble benyttet en  $\text{C}_{18}$  analytisk HPLC kolonne, på denne ble en liten prøve av fraksjonen løst i litt diklormetan og metanol applisert. 85 % og 90 % metanol i vann ble testet ut som mobilfase.

*Preparativ HPLC*

Fraksjon 7.3.3 ble løst i litt diklormetan og metanol og applisert på HPLC kolonnen, det ble benyttet en  $\text{C}_{18}$  preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt 85 % metanol i vann, kjøringen ble foretatt isokratisk. Ut ifra absorbanstopper som fremkom i kromatogrammet ble fraksjoner samlet inn, det ble samlet inn to fraksjoner som viste svake absorbanstopper ved 280 nm, fraksjon 7.3.3.1 og 7.3.3.2.

*NMR spektroskopi*

Begge fraksjonene ble analysert ved hjelp  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard.

**4.3.15 Videre separasjon av fraksjon 8***Sentrifugalt akselerert TLC*

Ferdig støpt silika TLC plate med gipstilsats ble først kondisjonert med diklormetan. Fraksjon 8, løst i diklormetan, ble så applisert litt etter litt. Ved hjelp av UV-lampe kunne de ulike komponentene i fraksjonen sees og fraksjoner ble samlet på bakgrunn av dette. Det ble i alt samlet 7 fraksjoner. Som mobilfase ble det brukt diklormetan, diklormetan m/ 20 % aceton og ren aceton, se Tabell 11 s.54.

Fraksjoner	Mobilfase
1 – 4	Diklormetan
4 – 6	Diklormetan m/ 20 % aceton
6 – 7	Aceton

**Tabell 11:** Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av 8*Analytisk TLC*

For å bestemme hvilke fraksjoner som inneholdt de samme forbindelsene og kunne slås sammen ble prøver av alle fraksjonene applisert på normalfase silika TLC plater. Disse ble utviklet med diklormetan, etter endt utvikling ble de tørket og betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. På bakgrunn av disse ble fraksjonene slått sammen, se Tabell 12.

TLC fraksjon	Fraksjon
1	8.1
2	8.2
3 – 4	8.3
5	8.4
6 – 7	8.5

**Tabell 12:** Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av 8*NMR spektroskopi*

Fraksjon 8.1 – 8.5 ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard. Spekteret til fraksjon 8.1 er gjengitt i Vedlegg 9 s.128.

*Massespektrometri*

Fraksjon 8.1 ble slått sammen med fraksjonene 7.1.1 og 7.1.2 og analysert ved hjelp av massespektrometri. Analysen ble utført på et LC/MS apparat. Det ble anvendt en silika  $\text{C}_{18}$  analytisk HPLC kolonne og mobilfase var 85 % metanol. Ioniseringsmetoden som ble benyttet var APCI og massemålinger ble foretatt i positiv mode. Spekteret er gjengitt i Vedlegg 29 s.139.

#### 4.3.16 Videre separasjon av fraksjon 8.4

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 8.4 ble løst i litt diklormetan og metanol og applisert på kolonnen, det ble benyttet en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt metanol-vann (3:1), i isokratisk kjøring. Ved å se på absorbanstopper ved 280 nm i kromatogrammet ble det samlet fraksjoner, det ble samlet to fraksjoner som viste absorbanstopp, fraksjon 8.4.1 og 8.4.2.

##### *NMR spektroskopi*

Fraksjon 8.4.1 og 8.4.2 ble analysert ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard.

#### 4.3.17 Videre separasjon av fraksjon 8.4.2

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 8.4.2 ble løst i litt diklormetan og metanol, og ble deretter applisert på HPLC kolonnen, det ble benyttet en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt metanol-vann (3:1), kjøringen ble foretatt isokratisk. Ved å se på absorbanstoppene ved 280 nm som ble målt i kromatogrammet ble det samlet inn fraksjoner, det ble samlet to fraksjoner som var begynnelsen og slutten på samme absorbanstopp. Disse ble kalt fraksjon 8.4.2.1 og 8.4.2.2.

##### *NMR spektroskopi*

Begge fraksjonene ble analysert ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR spektroskopi, fraksjon 8.4.2.2 ble også analysert ved hjelp av <sup>13</sup>C NMR, HSQC og HMBC spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard. For alle spektrene fra fraksjon 8.4.2.2 se Vedlegg 15-18 s.131-132.

##### *Massespektroskopi*

Fraksjon 8.4.2.2 ble analysert med massespektrometri på et MS-apparat, se Vedlegg 19 s.133.

Ioniseringsmetoden som ble benyttet var elektronionisasjon, og massemålinger ble foretatt i positiv mode. Analysen ble utført ved Kjemisk institutt, Universitet i Oslo.

#### 4.3.18 Videre separasjon av fraksjon 11

##### *Analytisk TLC*

For å finne den mobilfasen som var best egnet til å separere fraksjon 11 ved sentrifugalt akselerert TLC ble ulike mobilfaser testet ut ved analytisk TLC. En liten prøve av fraksjon 11 ble applisert på normalfase silika TLC plater og utviklet med ulike mobilfaser. Mobilfasene som ble testet ut var diklormetan, kloroform m/ 5 % etylacetat, kloroform m/ 10 % etylacetat og også de to siste tilsatt 1 % eddiksyre. TLC platene ble etter endt utvikling tørket, betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens.

##### *Sentrifugalt akselerert TLC*

Den ferdig støpte TLC platen med gipstilsats ble kondisjonert med kloroform m/ 5 % etylacetat og 1 % eddiksyre. Deretter ble fraksjon 11 løst i diklormetan og applisert på platen litt etter litt. Som mobilfase ble det brukt kloroform m/ 5 % etylacetat og 1 % eddiksyre isokratisk. Ved hjelp av UV-lampe ble det sett hvordan fraksjonen delte seg opp i ulike komponenter og ut ifra dette kunne fraksjoner samles. Det ble samlet inn fire fraksjoner, 11.1 – 11.4.

##### *NMR spektroskopi*

Fraksjon 11.1 – 11.4 ble analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi, som løsningsmiddel ble deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard benyttet.

#### 4.3.19 Videre separasjon av fraksjon 11.2

##### *Analytisk TLC*

For å bestemme hvilken mobilfase som egnet seg til å separere fraksjon 11.2 på VersaFlash kolonne separasjon ble ulike mobilfaser testet ut ved analytisk TLC. Små prøver av fraksjonen ble applisert på omvendt fase TLC plater, 50 %, 75 % metanol i vann og 100 % metanol ble testet ut som mobilfaser. Etter endt utvikling ble platene tørket, betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens.

*VersaFlash kolonne separasjon*

Kolonnen ble før kjøring kondisjonert med 300 ml av første mobilfase, metanol-vann (2:1). Fraksjon 11.2 løst i metanol ble applisert direkte på kolonnen, en C<sub>18</sub> kolonne. Som mobilfase ble det brukt metanol-vann (2:1), metanol-vann (3:1), metanol-vann (9:1) og ren metanol, se Tabell 13. Det ble i alt samlet 48 fraksjoner.

Fraksjoner	Mobilfase
1 – 11	Metanol-vann (2:1)
12 – 32	Metanol-vann (3:1)
33 – 37	Metanol-vann (9:1)
38 – 48	Metanol

**Tabell 13:** Mobilfaser benyttet ved fraksjonering av 11.2

*Analytisk TLC*

For å slå fast hvilke fraksjoner som inneholdt samme forbindelser og dermed kunne slås sammen ble prøver av alle fraksjonene applisert på omvendt fase TLC plater og utviklet med metanol. Etter endt utvikling ble platene tørket, betraktet i kort- og langbølget UV-lys og fremkalt med ceric reagens. På bakgrunn av TLC platene ble fraksjonene slått sammen, se Tabell 14.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1 – 2	11.2.1
3 – 6	11.2.2
7 – 12	11.2.3
13 – 14	11.2.4
15 – 17	11.2.5
18 – 20	11.2.6
21 – 22	11.2.7
23 – 27	11.2.8
28 – 37	11.2.9
38 – 48	11.2.10

**Tabell 14:** Sammenslåing av fraksjoner etter fraksjonering av 11.2

*NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det brukt deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard. Spekteret for fraksjon 11.2.9 er gjengitt i Vedlegg 20 s.133.

#### 4.3.20 Videre arbeid med fraksjon 11.2.7 – 11.2.9

Disse tre fraksjonene viste seg å inneholde samme forbindelse og ble derfor slått sammen til en fraksjon, fraksjon 11.2.7-9.

##### *NMR spektroskopi*

Denne fraksjonen ble analysert ved hjelp av  $^{13}\text{C}$  NMR-, COSY- og APT-spektroskopi. Som løsningsmiddel ble det benyttet deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard. Spektrene er gjengitt i Vedlegg 21-23 s.134-135.

##### *Massespektrometri*

Den sammenslåtte fraksjonen 11.2.7-9 ble analysert ved hjelp av massespektrometri. Dette ble utført på et LC/MS apparat. Fraksjonen ble eluert på en silika  $\text{C}_{18}$  analytisk HPLC kolonne med 75 % metanol som mobilfase. Ioniseringsmetoden var APCI og massemålinger ble foretatt i positiv mode. Spekteret etter analysen er gjengitt i Vedlegg 30 s.140.

##### *Bioassay*

Det ble utført følgende bioassay på fraksjon 11.2.7-9, resultater av samtlige bioassay tester er gitt i Tabell 35-37 s.100-101 og Vedlegg 32 s.142.

15-lipoksygenase hemming ved konsentrasjonene 6,25  $\mu\text{g/ml}$ , 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  og 50  $\mu\text{g/ml}$ .

Toksisitetstest (Brine Shrimp lethality assay) ved konsentrasjonene 25  $\mu\text{g/ml}$  og 50  $\mu\text{g/ml}$

Adenosin deaminase (ADA) hemming ved konsentrasjonene 25  $\mu\text{g/ml}$  og 50  $\mu\text{g/ml}$

Antibakteriell- og antifungaltest. Diklormetan ble benyttet som løsningsmiddel.



#### 4.3.21 Videre separasjon av fraksjon 11.2.3

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjonen ble løst i litt diklormetan og metanol, og ble deretter applisert på HPLC kolonnen.

Kolonnen var en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det benyttet metanol-vann (7:3) isokratisk. Fraksjoner ble samlet på bakgrunn av absorbanstopper ved 280 nm i kromatogrammet, det ble samlet fem fraksjoner, fraksjon 11.2.3.1 – 11.2.3.5.

##### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR spektroskopi, deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard ble brukt som løsningsmiddel. Spektrene fra fraksjonene 11.2.3.4 og 11.2.3.5 er gjengitt i Vedlegg 24-25 s.135-136.

#### 4.3.22 Videre separasjon av fraksjon 11.2.4

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 11.2.4 ble løst i litt diklormetan og metanol og applisert på HPLC kolonnen, det ble benyttet en C<sub>18</sub> preparativ HPLC kolonne. Som mobilfase ble det brukt 65 % metanol i vann isokratisk. På bakgrunn av absorbansmåling ved 280 nm i kromatogrammet ble fraksjoner samlet. Siden kromatogrammet kun viste en topp ble det bare samlet en fraksjon, fraksjon 11.2.4.1.

##### *NMR spektroskopi*

Fraksjon 11.2.4.1 ble analysert ved hjelp av <sup>1</sup>H NMR spektroskopi, løsningsmiddelet var deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard. Spektret er gjengitt i Vedlegg 27 s.137.

#### 4.3.23 Videre arbeid med fraksjon 11.2.3.4, 11.2.3.5 og 11.2.4.1

Ved sammenligning av <sup>1</sup>H NMR spektre fremkom det at fraksjon 11.2.3.4, 11.2.3.5 og 11.2.4.1 inneholdt samme forbindelse, disse fraksjonene ble derfor slått sammen til en fraksjon, denne ble kalt 11.2.3,4-k.

### *NMR spektroskopi*

Denne nye fraksjonen ble analysert ved hjelp av  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi. Som løsningsmiddel ble deuterert kloroform tilsatt TMS som intern standard brukt. Spekteret fra denne fraksjonen er gjengitt i Vedlegg 26 s.136.

### *Massespektrometri*

Den sammenslåtte fraksjonen 11.2.3,4-k ble analysert ved hjelp av massespektrometri. Dette ble gjort på et LC/MS apparat. Fraksjonen ble først eluert på en silika  $\text{C}_{18}$  analytisk HPLC kolonne med 75 % metanol som mobilfase. Ioniseringsmetoden var APCI og det ble foretatt massemålinger i positiv mode. Spekteret som fremkom etter analysen er gjengitt i Vedlegg 31 s.141.

### *Bioassay*

Fraksjonen ble testet for 15-lipoksygenase hemming ved konsentrasjonene 12,5  $\mu\text{g/ml}$  og 25  $\mu\text{g/ml}$ . Resultatene er gitt i Tabell 40 s.105.

Det ble også foretatt antimikrobiell testing på fraksjonen, dvs. antifungal- og antibakterielltest, se Vedlegg 32 s.142.

## 5 Resultater og diskusjon

### 5.1 Isolasjon, strukturoppklaring og bioassay

#### 5.1.1 Utgangsmateriale

##### *NMR spektroskopi*

Utgangsmaterialet var allerede analysert ved hjelp av  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi i hovedfagsoppgaven denne hovedoppgaven bygger på (Theis 2006), disse spektrene ble også benyttet i denne oppgaven, se Vedlegg 1-2 s.124.

##### *Bioassay*

Assay for radikalscavenging (DPPH-test) ble utført på både metanol (MeOH)- og diklormetan (DCM) -rækstraktet. Ingen av fraksjonene viste særlig høy radikalscavengeraktivitet, se Tabell 15.

Ekstrakt	Grad av scavenging
MeOH-Rå, 83 $\mu\text{g/ml}$	$22,4 \pm 0,5 \%$
DCM-Rå, 83 $\mu\text{g/ml}$	$29,0 \pm 0,5 \%$

**Tabell 15:** DPPH-test på rækstraktene

15-lipoksygenasehemming ble testet på DCM-Rå ved ulike konsentrasjoner, se Tabell 16.

Konsentrasjon	Grad av hemming
100 $\mu\text{g/ml}$	$99,7 \pm 0,4 \%$
50 $\mu\text{g/ml}$	$96,5 \pm 0,9 \%$
25 $\mu\text{g/ml}$	$77,9 \pm 7,2 \%$
12,5 $\mu\text{g/ml}$	$45,2 \pm 4,4 \%$

**Tabell 16:** 15-LO-test på DCM-Rå

Basert på disse tallene har DCM-Rå  $\text{IC}_{50}$  verdi på  $13,8 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$ . Dette er konsentrasjonen av DCM-Rå som gir 50 % hemming av 15-lipoksygenase. Dette er en meget høy hemmingsaktivitet.

Adenosin deaminase (ADA) hemming ble testet på DCM-Rå ved to ulike konsentrasjoner, se Tabell 17 s.62.

Konsentrasjon	Grad av hemming
100 µg/ml	57,6 ± 3,3 %
50 µg/ml	12,1 ± 4,4 %

**Tabell 17:** ADA-test på DCM-Rå

Dette gir DCM-Rå en  $IC_{50}$  verdi på  $89,0 \pm 4,7$  µg/ml. En slik hemming er ikke svært sterk, men er likevel av interesse, siden naturstoffer med ADA-hemmingsaktivitet er lite kjent.

På DCM-Rå ble det utført toksisitetssassay (Brine Shrimp lethality assay) ved to ulike konsentrasjoner, se Tabell 18.

Konsentrasjon	Grad av overlevelse
100 µg/ml	26,7 %
50 µg/ml	40,0 %

**Tabell 18:** Toksisitetssassay på DCM-Rå

Tallene som lå til grunn for disse verdiene var sprikende, og valgte derfor å ikke bruke de til å regne ut en  $LC_{50}$  verdi, det som kan sies er at  $LC_{50}$  ser ut til å være  $>50$  µg/ml. Testen viste at DCM-Rå gir større dødelighet enn blankprøven.

Antimikrobielle tester ble utført på DCM-Rå. Testing mot *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Escherichia coli* ga ikke brukbare resultater. På platen med *C. albicans* kunne det se ut som det var antydning til antifungal effekt av DCM-Rå. Testen på *Staphylococcus aureus* gikk etter planen og ga bra resultat, og denne viste at DCM-Rå inneholder flere komponenter med antibakteriell aktivitet mot denne bakterien, se Vedlegg 32 s.142.

### 5.1.2 Fraksjonering av metanolrækstraktet

#### *VersaFlash kolonne separasjon*

Metanolrækstraktet ble separert og fraksjonert på en omvendt fase kolonne. Det ble samlet 63 fraksjoner som basert på analytisk TLC ble slått sammen til fraksjonene M-1 – M-11, se Tabell 19 s.63. Noe av mengden råmateriale ble ikke løst og dermed ikke applisert på kolonnen, dette ble tørket og veid og mengden ble trukket fra den opprinnelige mengden. Det ble applisert 4,3791 g på kolonnen, det samlede utbyttet ble da 53,7 %. Det er usikkert hva dette tapet kan skyldes.

Fraksjon	Vekt
M-1	236,5 mg
M-2	1,5836 g
M-3	95,7 mg
M-4	54,5 mg
M-5	÷ mg
M-6	÷ mg
M-7	105,2 mg
M-8	101,1 mg
M-9	52,5 mg
M-10	65,9 mg
M-11	54,9 mg
M-1 – M-11	2,3499 g

**Tabell 19:** Metanolrækstrakt fraksjoner, ÷ betyr tilsynelatende <0 mg

### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi, spektrene fra fraksjon M-7 og M-8 var de som så mest interessante ut fordi de inneholdt aromatiske/olefiniske signaler, trolig hovedsakelig pterocarpaner, og var aktuelle å arbeide videre med. Fraksjonene M-2, M-3, M-4 og M-5 kunne også være interessante å rense videre, men disse ble ikke regnet som førsteprioritet, da det ble sett som mer interessant å arbeide videre med diklormetanrækstraktfraksjonene siden disse ga spektre med større innhold av interessante signaler. De andre spektrene så ikke ut til å inneholde forbindelser som gjorde at det ble prioritert å rense disse videre. De fleste fraksjonene så ut til å inneholde en del fett.

### *Bioassay*

Alle fraksjonene ble testet for radikalscavenging (DPPH-test) ved konsentrasjonen 83  $\mu\text{g/ml}$ . Fraksjonene viste svært varierende grad av scavenging, men ingen av de viste kraftig radikalscavenging evne, se Tabell 20 s.64. Det ser derfor ut til at den relativt svake radikalscavengingen av metanolrækstraktet ikke kan tilskrives noen enkeltkomponent i dette ekstraktet.

Fraksjon	Grad av scavenging
M-1	$4,5 \pm 2,2 \%$
M-2	$10,2 \pm 1,5 \%$
M-3	$13,5 \pm 1,0 \%$
M-4	$3,8 \pm 0,2 \%$
M-5	$17,4 \pm 1,8 \%$
M-6	$22,5 \pm 0,9 \%$
M-7	$34,3 \pm 1,8 \%$
M-8	$30,8 \pm 0,6 \%$
M-9	$26,4 \pm 2,4 \%$
M-10	$18,6 \pm 0,8 \%$
M-11	$8,6 \pm 2,5 \%$

**Tabell 20:** DPPH-test på metanolrækstrakt fraksjonene

### 5.1.3 Fraksjonering av diklormetanrækstraktet

For oversikt over fraksjoneringen av diklormetanrækstraktet og fraksjonsvekter, se Flytskjema 1 s.119.

#### *VersaFlash kolonne separasjon*

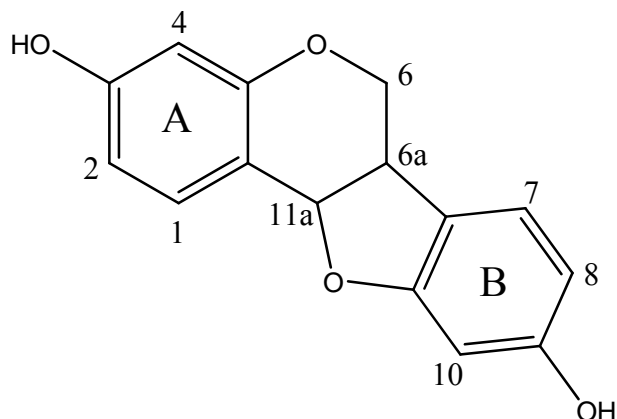
Diklormetanrækstraktet ble separert og fraksjonert på en normalfase silikakolonne. Det ble samlet 108 fraksjoner som basert på analytisk TLC ble slått sammen til fraksjonene 1 – 22. Ikke alt råmaterialet ble løst og kunne appliseres på kolonnen, mengden som ikke ble løst ble tørket og veid. Denne mengden ble trukket fra det opprinnelige uttaket av råmateriale og det endte opp med at 3,7554 g var applisert på kolonnen, dette ga et utbytte på 87,1 %.

#### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Fraksjonene 2, 4, 5, 7 – 12, 15, 18 og 19 så ut til å inneholde interessante forbindelser, ikke bare fett og forurensninger. Av disse var det fraksjon 6, 7, 8 og 11 som så mest interessante ut, se Vedlegg 3-6 s.125-126.

Dobbel dublett (H-6eq) ved ca. 4,3 ppm, multipllett (H-6a) ved ca. 3,6 ppm, tripllett/dobbel dublett (H-6ax) ved ca. 3,5 ppm og dublett (H-11a) ved ca. 5,5 ppm, i tillegg til dubletter og/eller singletter i 6-7,5 ppm området (de aromatiske hydrogenatomene) og singlett ved ca. 1,4 og/eller 1,8 ppm (metylgrupper på prenylsidekjede, åpen kjede ved ca. 1,8 ppm, og syklisert kjede ved ca. 1,4 ppm) er typiske signaler for pterocarpaner substituert med åpne eller sykliserte prenylsidekjeder,

se Figur 6. Fraksjonene som så interessante ut så ut til å kunne inneholde denne type forbindelser, men trengte betydelig mer opprensning.



**Figur 6:** Pterocarpan med hydroksylgrupper med biosyntetisk sannsynlig plassering, nummereringen av pterocarpaner avviker fra nummereringen for andre flavonoider

Fraksjon 1 og 3 så ut til å inneholde hovedsakelig fett.

Fraksjon 11 og 18 ble også analysert med  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi, og  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrene støttet opp om resultatene fra  $^1\text{H}$  NMR spektroskopien.

### *Bioassay*

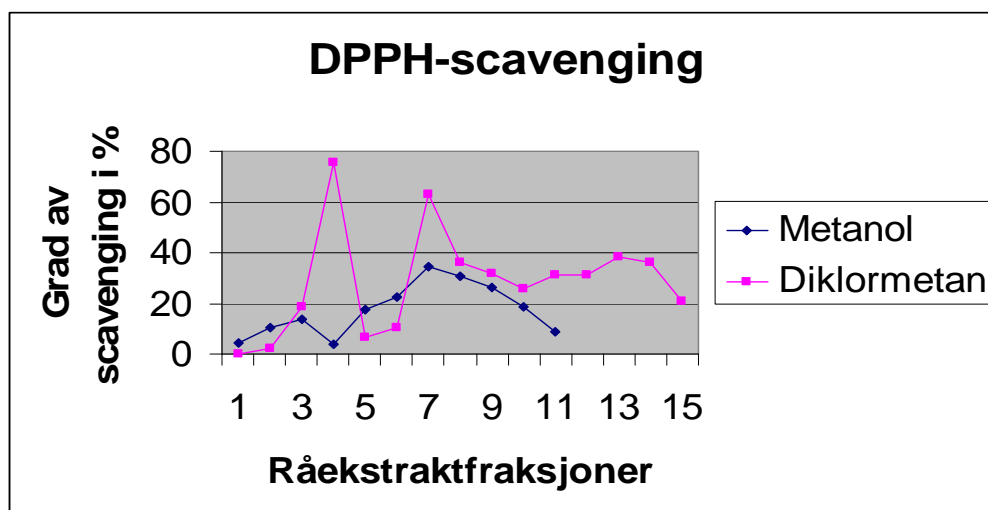
De fraksjonene som var store nok til at det kunne tas ut stoff av de ble testet for radikalscavenging (DPPH-test) ved konsentrasjonen 83  $\mu\text{g/ml}$ , se Tabell 21s.66. Disse fraksjonene viste også varierende grad av scavenging, men hadde generelt høyere grad av radikalscavenging enn fraksjonene fra metanolrækstraktet. Fraksjonene 8 og 11 hadde høyest aktivitet, med mer enn 50 % scavenging ved målt konsentrasjon.

Fraksjon	Grad av scavenging
1	-0,2 ± 0,1 %
6	2,0 ± 0,4 %
7	18,9 ± 1,7 %
8	75,4 ± 1,9 %
9	6,5 ± 0,3 %
10	10,6 ± 0,5 %
11	62,9 ± 1,0 %
12	36,2 ± 6,9 %
13	31,8 ± 1,3 %
14	25,9 ± 0,5 %
15	31,3 ± 0,8 %
16	31,0 ± 1,2 %
17	38,2 ± 1,0 %
18	36,2 ± 1,1 %
21	20,6 ± 1,5 %

**Tabell 21:** DPPH-test på diklormetanrækstrakt fraksjonene

#### 5.1.4 Videre arbeid

Siden det ble funnet høyere grad av aktivitet i fraksjonene fra diklormetanrækstraktet enn metanolrækstraktet, se Figur 7, og disse også viste NMR spektre som så mer interessante ut, dvs. med en betydelig andel av aromat/olefinsignaler, trolig hovedsakelig pterocarpaner, ble det valgt å fokusere på disse fraksjonene i det videre arbeidet for å identifisere og strukturoppklare bioaktive naturstoffer.



**Figur 7:** DPPH-scavenging ved 83 µg/ml, rækstraktene



### 5.1.5 Videre separasjon av fraksjon 6

For oversikt over den videre fraksjoneringen av fraksjon 6 og fraksjonsvekter, se Flytskjema 2 s.120.

#### *VersaFlash kolonne separasjon med detektor*

Fraksjon 6 ble separert og fraksjonert på en omvendt fase kolonne. Det ble samlet 121 fraksjoner, på bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet ble de slått sammen til fraksjonene 6.1 – 6.8. Det samlede utbyttet etter fraksjoneringen ble 96,3 %.

#### *NMR spektroskopi*

Fraksjonene 6.2 – 6.5 og 6.8 ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi.

Spekteret til fraksjon 6.2 viste det samme pterocarpanmønsteret som sett i de opprinnelige fraksjonene, med multipllett, tripllett, dublett og dobbel dublett i området 3,5-5,5 ppm. Dublettene i aromatområdet og singlettene rundt 1,8 ppm indikerte åpen prenylsidekjedesubstitusjon. Men mange signaler i spekteret tydet på at dette var en fraksjon med blanding av flere lignende forbindelser som trengte videre opprensning.

Fraksjon 6.3 hadde likt spekter som fraksjon 6.2 og så ut til å inneholde de samme forbindelsene, men denne fraksjonen var noe mindre og spekteret var derfor noe mer uklart. Siden disse fraksjonene var like ble de slått sammen til en fraksjon, 6.2+3.

Fraksjon 6.4 og 6.5 var så små prøver at spektrene deres ikke ble klare nok til at de kan brukes til strukturoppklaring.

Fraksjon 6.8 så ut til å inneholde hovedstoffet som fantes i fraksjon 6, men inneholdt ennå mye fett og måtte renses videre før den kunne strukturoppklares.

### 5.1.6 Videre arbeid med fraksjon 6.2 og 6.3 (6.2+3)

- Flytskjema 2

#### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 6.2+3 ble separert og fraksjonert på en omvendt fase kolonne. Det ble samlet en fraksjon som ga absorpsjonstopp i kromatogrammet, denne ga et utbytte på 75,9 %.

#### *NMR spektroskopi*

Fraksjonen ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Spekteret viste at fraksjonen inneholdt mange ulike forbindelser med samme pterocarpanmønster som sett tidligere, men fraksjonen var for liten til at det ble arbeidet mer med den.

### 5.1.7 Videre separasjon av fraksjon 6.8

- Flytskjema 2

#### *VersaFlash kolonne separasjon*

Fraksjon 6.8 ble separert og fraksjonert på normalfase silikakolonne. Det ble samlet 43 fraksjoner, disse ble på bakgrunn av analytisk TLC slått sammen til fraksjonene 6.8.1 – 6.8.5. Utbyttet etter separasjonen ble 82,5 %.

#### *NMR spektroskopi*

Fraksjonene 6.8.2 og 6.8.4 var store nok til at de kunne analyseres med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Spekteret til fraksjon 6.8.2 viste at denne inneholdt hovedsakelig fett. Fraksjon 6.8.4 så ut til å kunne innholde noen interessante forbindelser, den ga signaler i aromatområdet, og en singlett rundt 4 ppm som tyder på en metoksylgruppe i tillegg til det samme pterocarpanmønsteret som sett tidligere, men det var flere forbindelser i blanding og fraksjonen måtte renses videre.

### 5.1.8 Videre separasjon av fraksjon 6.8.4

- Flytskjema 2

#### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 6.8.4 ble separert og fraksjonert på en omvendt fase kolonne. Det ble samlet fem fraksjoner på bakgrunn av absorpsjonstopper i kromatogrammet, den ene av disse fraksjonene ga krystallvekst og ble delt i to, endte da opp med 6 fraksjoner, 6.8.4.1 – 6.8.4.6. Utbyttet etter separasjonen ble 633,8 %. I denne separasjonen måtte det benyttes en kraftig mobilfase som sannsynligvis har rensset ut forurensninger av kolonnen, og muligens noe kolonnemateriale, dette er grunnen til det store utbyttet.

#### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Ingen av spektrene viste tegn til at det fantes forbindelser av interesse i fraksjonene, var hovedsakelig bare signaler i fettområdet, ikke i aromatområdet.

### 5.1.9 Videre separasjon av fraksjon 7

For oversikt over den videre fraksjoneringen av fraksjon 7 og fraksjonsvekter, se Flytskjema 3 s.121.

#### *Sentrifugalt akselerert TLC*

Fraksjon 7 ble separert og fraksjonert på silika TLC plate, det ble i alt samlet 16 fraksjoner, på bakgrunn av analytisk TLC ble disse slått sammen til fraksjonene 7.1 – 7.6. Det samlede utbyttet ble 53,8 %. Det stor tapet kan skyldes irreversibel adsorpsjon.

#### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi.

Fraksjon 7.1 viste et meget rent spekter med det samme pterocarpanmønsteret i området 3-5,5 ppm som var sett tidligere. Fire dubletter i aromatområdet tydet på fire, dvs. to og to, ortho-stående aromatiske hydrogenatomer. To singletter rundt 1,8 ppm som ved integrering av spekteret ga 6 H-atomer hver tydet på at forbindelsen har to åpne prenylsidekjeder. Det ble satt opp ulike forslag til

molekylstruktur som ble testet opp mot kjente forbindelser, og sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR data med litteraturdata (Mitscher *et al.* 1988a) tydet på at fraksjon 7.1 inneholdt forbindelsen erybraedin A, men for å kunne være sikre på dette måtte fraksjonen renses noe mer.

Fraksjon 7.2 viste et lignende spekter som fraksjon 7.1 men var ikke like ren. Fraksjon 7.2 inneholdt mye fett og krevde derfor en del opprensning.

Fraksjon 7.3 inneholdt også mye fett, men viste også antydning til prenylsubstituert pterocarpan, var derfor også interessant å rense videre. Signalmønsteret i spekteret gjorde at det ble tatt mistanke om at denne fraksjonen kunne inneholde forbindelsen kumarsyre. En sammenligning av fraksjonen mot kumarsyre ble gjennomført, se punkt 5.1.13.

Fraksjonene 7.4 og 7.5 viste spekter med mye fett og ikke interessante signaler i andre områder. Disse ble ikke studert videre.

Fraksjon 7.6 ga et spekter med signaler fra mange ulike forbindelser, også pterocarpaner, i tillegg hadde den to singletter ved 4,0 ppm som tydet på metoksylygrupper, det gjør at denne fraksjonen kunne vært interessant å jobbe videre med. Men pga. den lave vekten og den høye graden av opprensning som hadde vært nødvendig ved videre undersøkelser, ble den ikke bearbeidet videre.

#### **5.1.10 Videre separasjon av fraksjon 7.1**

- Flytskjema 3

##### *Preparativ HPLC*

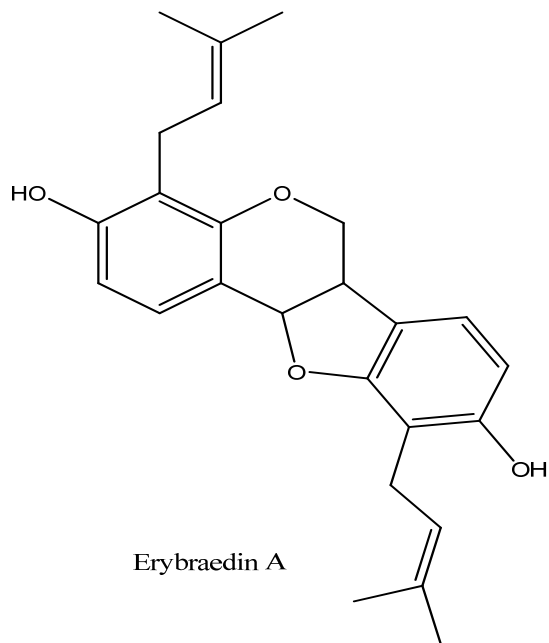
Fraksjon 7.1 ble separert og fraksjonert på en omvendt fase kolonne. Det ble samlet tre fraksjoner, 7.1.1 – 7.1.3, på bakgrunn av kromatogrammet. Det samlede utbyttet etter fraksjoneringen ble 72,0 %.

##### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi, fraksjon 7.1.2 ble også analysert med  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi.

Fraksjon 7.1.1 inneholdt liten mengde stoff og ga derfor et svakt spekter, men med klare topper, se Vedlegg 7 s.127. Fraksjonen viste samme mønster av signaler som sett i spekteret til fraksjon 7.1.

Fraksjon 7.1.2 var en stor fraksjon og ga derfor et godt spekter med klare signaler, se Vedlegg 8 s.127. Her fantes også det samme mønsteret av signaler som i fraksjon 7.1 og 7.1.1. Dette ga en mistanke om at forbindelsen i fraksjonene 7.1.1 og 7.1.2 kunne være erybraedin A, se Figur 8. Det ble dermed gjort en sammenligning med litteraturreferanseverdier for erybraedin A, se Tabell 22-23 s.72. Ut ifra sammenligningen av verdier kunne det slås fast at forbindelsen i fraksjon 7.1.2 var erybraedin A. Siden spekteret til fraksjon 7.1.1 viste like signaler som det til fraksjon 7.1.2 inneholdt dermed også denne fraksjonen erybraedin A.



**Figur 8:** Molekylstruktur for erybraedin A (Mitscher *et al.* 1988a)

Hydrogen	Erybraedin A, (Mitscher <i>et al.</i> 1988a)	Fraksjon 7.1.2, (Vedlegg 8)
H-1	7,29, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz	7,29, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz
H-2	6,55, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz	6,56, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz
H-7	6,95, <i>d</i> , 1H, J=7,8 Hz	6,95, <i>d</i> , 1H, J=8 Hz
H-8	6,37, <i>d</i> , 1H, J=7,8 Hz	6,37, <i>d</i> , 1H, J=8 Hz
H-6a	3,56, <i>dd</i> , 1H, J=10,8 Hz	3,57, <i>dd</i> , 1H
H-6eq	4,29, <i>dd</i> , 1H, J=4,8, 10,8 Hz	4,27, <i>dd</i> , 1H, J=4,5, 10,3 Hz
H-6ax	3,49, <i>m</i> , 1H	3,50, <i>m</i>
H-11a	5,47, <i>d</i> , 1H, J=7,2 Hz	5,47, <i>d</i> , 1H, J=6,6 Hz
H-1'	3,48, <i>m</i> , 4H	3,46, <i>m</i>
H-2'	5,18, <i>t</i> , 1H	5,22, <i>t</i>
H-2'	5,28, <i>m</i> , 1H	5,28, <i>t</i>
H-4'	1,73, <i>s</i> , 6H	1,73, <i>s</i> , 6H
H-5'	1,80, <i>s</i> , 6H	1,8, <i>s</i> , 6H
H-OH	5,5, <i>s</i> , 1H	
H-OH	5,41, <i>s</i> , 1H	

**Tabell 22:** Sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR verdier for fraksjon 7.1.2 og erybraedin A

Erybraedin A, (Mitscher <i>et al.</i> 1988a)	Fraksjon 7.1.2, (Vedlegg 10)
17,93	17,87
18,03	
22,45	22,37
23,25	23,18
25,86	25,79
25,96	
40,10	40,03
66,94	66,86
78,93	78,85
108,18	108,08
109,79	109,73
110,41	110,22
112,76	112,67
115,07	114,89
118,91	118,81
121,56	121,40
121,85	121,68
122,43	122,35
129,46	129,41
134,52	134,60
135,10	135,13
154,03	153,93
155,16	155,67
155,82	155,84
158,53	158,46

**Tabell 23:** Sammenligning av  $^{13}\text{C}$  NMR verdier for fraksjon 7.1.2 og erybraedin A

Fraksjon 7.1.3 viste også samme mønster av signaler som i fraksjonene 7.1.1 og 7.1.2, men inneholdt i tillegg forurensninger.

#### 5.1.10.1 Erybraedin A

Erybraedin A er et isoflavonoid, og tilhører undergruppen pterocarpaner. Forbindelsen ble første gang isolert og beskrevet i 1988, og ble da isolert fra etanolekstrakt av røttene til planten *Erythrina mildbraedii* (Mitscher et al. 1988a). I denne studien ble erybraedin A også testet for antimikrobiell aktivitet. Substansen viste aktivitet mot *Staphylococcus aureus* og *Mycobacterium smegmatis*, men ingen påvisbar aktivitet mot *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* og *Pseudomonas aeruginosa*. I ettertid er erybraedin A funnet i flere andre *Erythrina*-arter.

Erybraedin A er tidligere isolert fra stammen til planten *Erythrina subumbrans*. Ved denne isoleringen ble også substansen testet for antimikrobiell aktivitet, det ble testet mot ulike *Streptococcus* arter, *Staphylococcus aureus* og resistente *Staphylococcus aureus*. Erybraedin A viste MIC (minimum inhibitory concentration) på ca 1 µg/ml mot de ulike *Streptococcus* arter, 1,56 µg/ml mot *S. aureus* og fra 0,78 – 3,13 µg/ml mot ulike stammer av resistente *S. aureus*. Til sammenligning viste oxacillin MIC på 0,02 – 4,0 µg/ml mot ulike *Streptococcus* arter, 0,03 – 25 µg/ml mot *S. aureus* og >256 µg/ml mot resistente *S. aureus*. (Rukachaisirikul et al. 2007)

Erybraedin A har også blitt isolert fra røttene til planten *Erythrina zeyheri* og ble i samme studien vist å ha MIC på 1,56 – 3,13 µg/ml mot ulike vancomycin-resistente *Enterococcus* arter (VRE) og MIC på 3,13 µg/ml mot methicillin-resistent *Staphylococcus aureus* (MRSA). Det ble også vist at i tillegg til å ha egen aktivitet mot VRE og MRSA virker erybraedin A delvis synergistisk eller additivt sammen med vancomycin. (Sato et al. 2004)

Erybraedin A er også isolert fra rotbarken av planten *Erythrina eriotricha* (Nkengfack et al. 1995), fra rotbarken av planten *Erythrina burtii* (Yenesew et al. 2002) og fra rotbarken av planten *Erythrina latissimia* (Wanjala et al. 2002). I den siste studien ble det også vist at erybraedin A hadde aktivitet mot *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida mycoderma* og *Saccharomyces cerevisiae*.

Erybraedin A er bare en gang tidligere isolert fra planten *Erythrina senegalensis*, det ble gjort av Annette Theis i 2006 under gjennomføringen av hennes hovedfagsoppgave (Theis 2006).

#### Bioassay

Fraksjon 7.1.2 (erybraedin A) ble testet for 15-lipoksygenasehemming ved to konsentrasjoner, se Tabell 24.

Konsentrasjon	Grad av hemming
12,5 µg/ml	42,1 ± 6,9 %
25 µg/ml	76,6 ± 10,2 %

**Tabell 24:** 15-LO test på fraksjon 7.1.2

På bakgrunn av disse verdiene kunne det regnes ut en  $IC_{50}$  verdi for fraksjonen, denne var  $14,7 \pm 2,3$  µg/ml. Dette viser at fraksjonen hadde en høy grad av hemmingsaktivitet.

Fraksjon 7.1.2 (erybraedin A) ble også testet for antimikrobiell aktivitet. Denne viste kraftig aktivitet mot *Staphylococcus aureus*, se Vedlegg 32 s. 142, mens resultatene fra testing mot *Candida albicans*, *Escherichia coli* og *Pseudomonas aeruginosa*, som nevnt tidligere, kunne ikke brukes. Aktiviteten mot *S.aureus* funnet i dette forsøket stemmer godt overens med tidligere antimikrobielle studier utført på erybraedin A.

#### 5.1.11 Videre separasjon av fraksjon 7.2

- Flytskjema 3

#### Preparativ TLC

Fraksjon 7.2 ble separert og fraksjonert på en normalfase silika TLC glassplate. Det ble i alt samlet fem fraksjoner, 7.2.1 – 7.2.5. Det samlede utbyttet av fraksjoneringen ble 79,9 %.

#### NMR spektroskopi

Fraksjonene 7.2.1, 7.2.3 og 7.2.4 ble analysert med  $^1H$  NMR spektroskopi. Fraksjon 7.2.3 ble også analysert med  $^{13}C$  NMR spektroskopi.

Fraksjon 7.2.1 ga et spekter som viste at prøven inneholdt hovedsakelig fett.



Fraksjon 7.2.3 inneholdt relativt mye stoff og ga derfor et tydelig spekter. I spekteret fantes det samme pterocarpanmønster av signaler som var sett i tidligere fraksjoner. To singletter og to dubletter i aromatområdet tydet på to ortho-stående og to para-stående aromatiske hydrogen. To singletter rundt 1,8 ppm og to singletter rundt 1,4 ppm tydet på en åpen og en syklisert prenylsidekjede. To forslag til strukturer ble satt opp på bakgrunn av informasjonen over og ble søkt etter i Scifinder, det ble da funnet at disse var de kjente forbindelsene erybraedin D og orientanol C, se Figur 9 s.76. Fraksjonen inneholdt ennå forurensninger, spekteret var ikke helt rent, og skulle renses videre før det ble gjort sammenligning mot referanseverdier.

Fraksjon 7.2.4 inneholdt liten mengde stoff og ga et spekter med for svake signaler til at det var mulig å tolke det.

#### **5.1.12 Videre separasjon av fraksjon 7.2.3**

- Flytskjema 3

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 7.2.3 ble separert og fraksjonert på en omvendtfase kolonne. På bakgrunn av absorbans registrert i kromatogrammet ble det samlet tre fraksjoner, 7.2.3.1 – 7.2.3.3. Det samlede utbyttet ble 62,6 %. Grunnen til det store tapet er usikker, men ufullstendig eluering synes som en mulig forklaring.

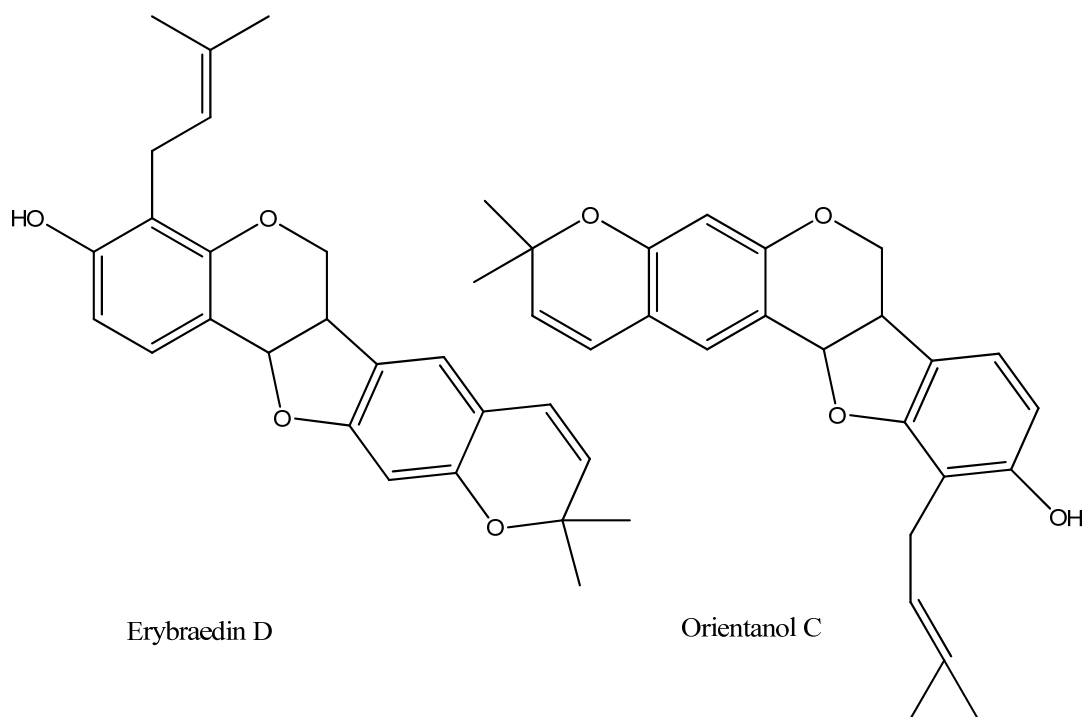
##### *NMR spektroskopi*

De tre fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi.

I spekteret til fraksjon 7.2.3.1 fantes det samme mønsteret av signaler som tidligere sett i spekteret til fraksjon 7.2.3, men spekteret var renere og hadde mindre forurensninger, se Vedlegg 11 s.129.

Fraksjon 7.2.3.2 viste et helt likt spekter som fraksjon 7.2.3.1, men med et noe dårligere signal-støyforhold på grunn av at fraksjonen inneholdt en liten mengde stoff, se Vedlegg 12 s.129. Siden spektrene viste helt like signaler ble det besluttet å slå sammen fraksjonene.

Den nye samlede fraksjonen ble analysert med  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi, se Vedlegg 13 s.130. Vi hadde allerede etter å ha sett på spekteret til fraksjon 7.2.3 fattet en mistanke om at den kunne inneholde forbindelsen erybraedin D eller orientanol C. Siden spektrene til fraksjon 7.2.3.1 og 7.2.3.2 viste samme signalmønster ble verdiene sammenlignet med litteraturreferanseverdier på erybraedin D og orientanol C for å slå fast om det faktisk var en av disse forbindelsene som var isolert, se Tabell 25 s.77 og Tabell 26 s.78. Denne sammenligningen av NMR verdier bekreftet at forbindelsen i fraksjonene 7.2.3.1 og 7.2.3.2 var erybraedin D.



**Figur 9:** Molekylstruktur for erybraedin D (Mitscher *et al.* 1988b) og orientanol C (Tanaka *et al.* 1998)

Hydrogen	Erybraedin D, (Mitscher <i>et al.</i> 1988b)	Orientanol C, (Tanaka <i>et al.</i> 1998)	Fraksjon 7.2.3.1, (Vedlegg 11)
H-1	7,27, <i>d</i> , 1H, J=8,1 Hz	7,14, <i>s</i>	7,27, <i>d</i> , 1H, J=7,8 Hz
H-2	6,56, <i>d</i> , 1H, J=8,1 Hz		6,56, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz
H-4		6,37, <i>s</i>	
H-6a	3,48, <i>m</i> , 1H	3,49, <i>m</i>	3,48, <i>m</i> , 1H
H-6ax	3,58, <i>dd</i> , 1H J=10,8, 7,5 Hz	3,61, <i>t-like</i> , J=11 Hz	3,58, <i>dd</i> , 1H
H-6eq	4,27, <i>dd</i> , 1H, J=4,5, 10,8 Hz	4,21, <i>dd</i> , J=11, 5,1 Hz	4,27, <i>dd</i> , 1H, J=4,8, 10,7 Hz
H-7	6,85, <i>s</i> , 1H	6,95, <i>d</i> , J=8 Hz	6,84, <i>s</i> , 1H
H-8		6,38, <i>d</i> , J=8 Hz	
H-10	6,34, <i>s</i> , 1H		6,33, <i>s</i> , 1H
H-11a	5,48, <i>d</i> , 1H, J=7,5 Hz	5,43, <i>d</i> , J=7,3 Hz	5,47, <i>d</i> , 1H, J=6,7 Hz
H-1'	3,40, <i>d</i> , 2H, J=7,0 Hz	6,33, <i>d</i> , J=10,3 Hz	3,40, <i>d</i> , 2H, J= 7,1 Hz
H-1''	6,27, <i>d</i> , 1H, J=9,9 Hz	3,34, <i>dd</i> , J=15,4, 7,3 Hz	6,26, <i>d</i> , 1H, J=9,8 Hz
H-1'''		3,40, <i>dd</i> , J=15,4, 7,3 Hz	
H-2'	5,23, <i>t</i> , 1H, J=7 Hz	5,55, <i>d</i> , J=10,3 Hz	5,22, <i>t</i> , 1H
H-2''	5,46, <i>d</i> , 1H, J=7,5 Hz	5,28, <i>t</i> , J=7,3 Hz	5,42, <i>d</i> , 1H, J=9,75 Hz
H-3'',4''	1,41, <i>s</i> , 6H	1,80, <i>s</i>	1,41, <i>s</i> , 6H
H-5''		1,74, <i>s</i>	
H-4'	1,73, <i>s</i> , 3H	1,44, <i>s</i>	1,73, <i>s</i> , 3H
H-5'	1,80, <i>s</i> , 3H	1,41, <i>s</i>	1,80, <i>s</i> , 3H

**Tabell 25:** Sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR verdier for fraksjon 7.2.3.1, erybraedin D og orientanol C

Erybraedin D, (Nkengfack <i>et al.</i> 1995)	Fraksjon 7.2.3.(1+2), (Vedlegg 13)
17,9	17,9
22,5	22,4
25,7	25,8
27,0	27,8
39,7	39,4
66,9	66,8
78,7	
79,2	79,1
98,9	99,3
109,8	109,8
110,5	
112,5	112,4
114,6	114,7
118,0	119,2
122,3	121,7
122,4	122,0
123,9	122,1
128,1	127,5
129,5	129,3
134,5	134,6
153,7	153,9
154,8	154,5
156,2	155,7
159,2	160,3

**Tabell 26:** Sammenligning av  $^{13}\text{C}$  NMR verdier for fraksjon 7.2.3.(1+2) og erybraedin D

Fraksjon 7.2.3.3 ga et spekter med det samme pterocarpanmønsteret som sett tidligere, se Vedlegg 14 s.130. Signalene i aromatområdet og rundt 1,4 og 1,8 ppm tydet på at denne forbindelsen også hadde en åpen og en syklisert prenylsidekjede, men verdiene var noe annerledes enn det som var sett for erybraedin D. Ulike forslag til struktur ble satt opp, og det ble søkt etter disse blant kjente strukturer. Ingen kjente strukturer hadde  $^1\text{H}$  NMR verdier som stemte overens med signalene i spekteret til fraksjon 7.2.3.3, dette førte til en antagelse om at det var isolert et nytt stoff som måtte undersøkes nærmere. Når denne fraksjonen ved senere anledning ble tatt frem for å analyseres med 2-dimensjonal NMR spektroskopi ble det tatt opp et nytt  $^1\text{H}$  NMR spekter, dette viste at forbindelsen i fraksjonen dessverre hadde degradert ved henstand, dvs. den ga ikke lenger de samme signalene i spekteret.

### Massespektrometri

For å finne molekylvekten til forbindelsen i fraksjon 7.2.3.(1+2) ble fraksjonene slått sammen og massespektrometrisk analysert på LC/MS-apparat. Analysen ga en topp med  $m/z$  391 ( $M+1$ ), dette stemmer med molekylvekten til erybraedin D som er 390 og var dermed med på å bekrefte at det var denne forbindelsen som fantes i fraksjonene, se Vedlegg 28 s.138.

#### 5.1.12.1 Erybraedin D

Erybraedin D er et isoflavonoid og tilhører undergruppen pterocarpaner. Forbindelsen ble første gang isolert i form av en ester fra planten *Erythrina mildbraedii* (Mitscher *et al.* 1988b). I den samme studien ble det vist at erybraedin D hadde antimikrobiell aktivitet mot *Staphylococcus aureus* og *Mycobacterium smegmatis*.

I senere tid har erybraedin D også blitt isolert fra rotbarken til planten *Erythrina eriotricha* (Nkengfack *et al.* 1995). I denne studien ble det også vist at forbindelsen har antimikrobiell aktivitet mot *S.aureus* med MIC på 78,3  $\mu\text{g/ml}$ , mens den ikke viste noen antimikrobiell effekt på *Escherichia coli*.

Søk i tilgjengelige akademiske databaser viste at erybraedin D ikke er blitt isolert fra planten *Erythrina senegalensis* tidligere, isoleringen av forbindelsen i denne oppgaven er dermed det første beskrevne tilfellet fra denne planten.

### Bioassay

Fraksjon 7.2.3.(1+2) (erybraedin D) ble testet for 15-lipoksygenasehemming ved to konsentrasjoner, se Tabell 27.

Konsentrasjon	Grad av hemming
12,5 $\mu\text{g/ml}$	60,8 $\pm$ 4,2 %
25 $\mu\text{g/ml}$	91,8 $\pm$ 2,7 %

**Tabell 27:** 15-LO test på fraksjon 7.2.3.(1+2)

På bakgrunn av disse tallene ble det beregnet at fraksjonen har en  $IC_{50}$  verdi på mindre enn 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , for å kunne regne ut nøyaktig verdi måtte det blitt foretatt måling av grad av hemming ved lavere konsentrasjoner enn 12,5  $\mu\text{g/ml}$ . Dette er en meget høy grad av hemming.

Fraksjon 7.2.3.(1+2) (erybraedin D) ble også testet for antimikrobiell aktivitet. Fraksjonen viste innhold av forbindelser med aktivitet mot *Staphylococcus aureus*, se Vedlegg 32 s.142. Dette resultatet stemmer godt overens med tidligere antimikrobielle funn på erybraedin D. Som tidligere nevnt kunne ikke resultatene fra testing mot *Candida albicans*, *Escherichia coli* og *Pseudomonas aeruginosa* anvendes, og det kunne derfor ikke sies noe om fraksjonens aktivitet mot disse mikroorganismene.

### **5.1.13 Videre arbeid med fraksjon 7.3**

- Flytskjema 3

#### *Analytisk TLC*

Etter analyse med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi av fraksjon 7.3 ble det fattet mistanke om at denne kunne inneholde forbindelsen kumarsyre. For å teste om dette stemte ble en liten prøve av fraksjonen og en standardprøve av kumarsyre applisert på en normalfase silika TLC plate og utviklet med etylacetat tilsatt 1 % eddiksyre. Etter endt utvikling ble platen tørket og fremkalt med ceric reagens.

Betraktning av platen viste at de to prøvene ikke hadde vandret likt og fraksjonen inneholdt ingen komponenter som kunne være kumarsyre.

#### *Preparativ TLC*

Fraksjon 7.3 ble separert og fraksjonert på en normalfase silika TLC plate. Det ble samlet fire fraksjoner etter separasjonen, 7.3.1 – 7.3.4. Det samlede utbyttet etter fraksjoneringen ble 35,4 %. Høy grad av irreversibel adsorpsjon ses ofte ved preparativ TLC, og kan være forklaringen på det lave utbyttet.

#### *NMR spektroskopi*

Alle fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi.

Fraksjon 7.3.1 ga et spekter som viste at fraksjonen inneholdt hovedsaklig bare fett og var derfor ikke interessant å jobbe videre med.

Fraksjon 7.3.2 ga et spekter med dårlig signal-støyforhold og svake signaler på grunn av liten mengde stoff i prøven. Men signalene som fremkom i spekteret viste at denne fraksjonen kunne inneholde lignende prenylsubstituerte pterocarpaner som var funnet i tidligere fraksjoner, dette gjorde fraksjonen interessant å jobbe mer med.

Fraksjon 7.3.3 ga et spekter med interessante signaler i aromatområdet, men viste også innhold av mye fett.

Fraksjon 7.3.4 ga et spekter som viste stort innhold av fett, og lite andre signaler. I tillegg var det en liten fraksjon som ga svake signaler og mye støy, og ble dermed ikke prioritert å arbeide videre med.

#### **5.1.14 Videre separasjon av fraksjon 7.3.2**

- Flytskjema 3

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 7.3.2 ble separert og fraksjonert på en omvendtfase kolonne. Det ble på bakgrunn av kromatogrammet samlet to fraksjoner, 7.3.2.1 og 7.3.2.2. Det samlede utbyttet etter fraksjoneringen var 51,4 %. En mulig forklaring på det store tapet er irreversibel adsorpsjon på kolonnen, en annen er at mobilfase ikke eluerte ut alle komponentene i fraksjonen som ble separert.

##### *NMR spektroskopi*

Fraksjon 7.3.2.1 ga opphav til absorpsjonstopp i kromatogrammet og ble analysert med  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi. Fraksjonen ga et spekter med samme mønster av signaler som tidligere sett i fraksjon 7.2.3.3 og det kunne dermed antas at disse to fraksjonene inneholdt samme forbindelse, og ble dermed slått sammen. Som beskrevet tidligere så denne forbindelsen ut til å være et prenylsubstituert pterocarpan som ikke tidligere er beskrevet i litteraturen. Men da den sammenslåtte fraksjonen ble tatt frem etter en tids henstand for videre arbeid viste et nyopptatt  $^1\text{H}$  NMR spekter at den opprinnelige forbindelsen ikke lenger fantes i fraksjonen, altså hadde forbindelsen degradert.

### 5.1.15 Videre separasjon av fraksjon 7.3.3

- Flytskjema 3

#### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 7.3.3 ble separert og fraksjonert på en omvendtfase kolonne. Av kromatogrammet fremkom det ingen absorpsjonstopper men to fraksjoner ble samlet, fraksjon 7.3.3.1 og 7.3.3.2. Det samlede utbyttet etter fraksjoneringen var ikke mulig å regne ut på grunn av manglende utgangsvekt.

#### *NMR spektroskopi*

Begge fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi, men ingen av dem ga spekter med interessante signaler. Spektrene viste kun signaler fra løsemiddel og fett.

### 5.1.16 Videre separasjon av fraksjon 8

For oversikt over den videre fraksjonering av fraksjon 8 og fraksjonsvekter, se Flytskjema 4 s.122.

#### *Sentrifugalt akselerert TLC*

Fraksjon 8 ble separert og fraksjonert på normalfase silika TLC plate. Det ble samlet totalt 7 fraksjoner som på bakgrunn av testing med analytisk TLC ble slått sammen til fem fraksjoner, 8.1 – 8.5. Det samlede utbyttet etter fraksjoneringen ble 83,6 %.

#### *NMR spektroskopi*

Alle de fem fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi.

Fraksjon 8.1 ga et spekter med klare signaler og lite forurensninger. Signalmønsteret var likt som det sett i spekteret til fraksjon 7.1.2, se Vedlegg 9 s.128. En sammenligning mot de samme litteraturreferanseverdiene viste at i fraksjon 8.1 fantes også forbindelsen erybraedin A, se Tabell 28 s.83.



Hydrogen	Erybraedin A, (Mitscher <i>et al.</i> 1988a)	Fraksjon 8.1, (Vedlegg 9)
H-1	7,29, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz	7,30, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz
H-2	6,55, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz	6,57, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz
H-7	6,95, <i>d</i> , 1H, J=7,8 Hz	6,96, <i>d</i> , 1H, J=8 Hz
H-8	6,37, <i>d</i> , 1H, J=7,8 Hz	6,38, <i>d</i> , 1H, J=8 Hz
H-6a	3,56, <i>dd</i> , 1H, J=10,8 Hz	3,57, <i>dd</i> , 1H
H-6eq	4,29, <i>dd</i> , 1H, J=4,8, 10,8 Hz	4,27, <i>dd</i> , 1H, J=4,3, 10,1 Hz
H-6ax	3,49, <i>m</i> , 1H	3,51, <i>m</i>
H-11a	5,47, <i>d</i> , 1H, J=7,2 Hz	5,47, <i>d</i> , 1H, J=6,5 Hz
H-1'	3,48, <i>m</i> , 4H	3,38, <i>m</i>
H-2'	5,18, <i>t</i> , 1H	5,22, <i>t</i>
H-2'	5,28, <i>m</i> , 1H	5,28, <i>t</i>
H-4'	1,73, <i>s</i> , 6H	1,74, <i>s</i> , 6H
H-5'	1,80, <i>s</i> , 6H	1,8, <i>s</i> , 6H
H-OH	5,5, <i>s</i> , 1H	5,35, <i>s</i> , 1H
H-OH	5,41, <i>s</i> , 1H	5,30, <i>s</i> , 1H

**Tabell 28:** Sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR verdier for fraksjon 8.1 og erybraedin A

Fraksjon 8.2 ga et spekter som viste innhold av mye terpenoider, men ikke noen av de pterocarpanforbindelsene som er sett tidligere. Fraksjonen kunne vært interessant å jobbe videre med, men ble ikke prioritert over de andre som har vist innhold av prenylsubstituerte pterocarpaner.

Fraksjon 8.3 ga et spekter med signaler som stammer fra mange ulike forbindelser. Disse signalene kunne tyde på at fraksjonen inneholder forbindelser som kunne vært interessant å se nærmere på, men å få isolert disse ville kreve en del opprensning.

Fraksjon 8.4 ga et ganske rent spekter med relativt lite forurensninger. Signalmønsteret tydet på at det også her kunne være prenylsubstituerte pterocarpanforbindelser lignende de som var sett tidligere. Spekteret inneholdt også en singlett ved ca. 4 ppm som tydet på metoksygruppe i forbindelsen og som gjorde fraksjonen interessant å se nærmere på. Men fraksjonen trengte ytterligere opprensning før det kunne gjøres strukturoppklaring på forbindelsen.

Fraksjon 8.5 viste et lignende spekter som fraksjon 8.4 men inneholdt mer forurensninger og mindre stoff, det ble derfor valgt å jobbe videre med bare fraksjon 8.4 i stedet for begge fraksjonene.

*Massespektrometri*

For å bekrefte molekylvekten til forbindelsen i fraksjonene 7.1.1, 7.1.2 og 8.1, og dermed få ytterligere bevis for at forbindelsen er erybraedin A, ble fraksjonene slått sammen og massespektrometrisk analysert på LC/MS-apparat. Analysen viste at prøven inneholdt en topp med  $m/z$  393 (M+1), dette stemmer overens med massen til erybraedin A, se Vedlegg 29 s.139.

**5.1.17 Videre separasjon av fraksjon 8.4**

- Flytskjema 4

*Preparativ HPLC*

Fraksjon 8.4 ble separert og fraksjonert på en omvendtfase kolonne. Det ble samlet to fraksjoner på bakgrunn av absorpsjon i kromatogrammet, fraksjon 8.4.1 og 8.4.2. Det samlede utbyttet etter fraksjoneringen ble 29,8 %. Høyt innhold av ikke-absorberende stoffer kunne være en forklaring på det lave utbyttet, men dette ble kontrollert (resten av eluatet ble veid), og det syntes ikke å være tilfelle.

*NMR spektroskopi*

Begge fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi. Fraksjon 8.4.1 viste et spekter hovedsakelig uten andre signaler enn de som kom fra løsemiddelet.

Fraksjon 8.4.2 ga et spekter med mange interessante signaler, fraksjonen så ut til å inneholde pterocarpanforbindelsen sett i fraksjon 8.4. Men ut ifra signalene så det ut til at det enda var to ganske like forbindelser i blanding i fraksjonen, og for å kunne tolke signalene burde den renses ytterligere.

**5.1.18 Videre separasjon av fraksjon 8.4.2**

- Flytskjema 4

*Preparativ HPLC*

Fraksjon 8.4.2 ble separert og fraksjonert på omvendtfase kolonne. Fraksjonen ga kun opphav til en absorbanstopp i kromatogrammet, men denne ble delt i to fraksjoner, 8.4.2.1 og 8.4.2.2. Det samlede utbyttet etter fraksjoneringen var 93,3 %.

*NMR spektroskopi*

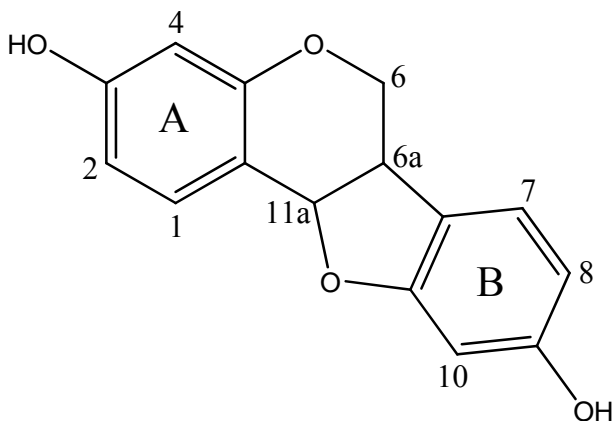
Begge fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi.

Fraksjon 8.4.2.1 ga et spekter som kunne tyde på at det i den fraksjonen enda fantes to forbindelser i blanding.

Fraksjon 8.4.2.2 ga et renere spekter, her så det ut til at en av forbindelsene var blitt skilt vekk og at det var igjen hovedsakelig bare en forbindelse i fraksjonen, se Vedlegg 15 s.131. Spekteret viste det samme pterocarpanmønsteret som sett i spektrene til fraksjon 8.4.2 og fraksjon 8.4. Siden denne fraksjonen ga et spekter med renere signaler, dvs. hovedsakelig en forbindelse, lite støy og sterke signaler ble det valgt å jobbe videre med denne fraksjonen.

**5.1.19 Videre arbeid med fraksjon 8.4.2.2***Strukturopklaring*

$^1\text{H}$  NMR spekteret av fraksjon 8.4.2.2 viste signaler som indikerte at det her fantes en forbindelse med samme pterocarpanskjelett som sett i forbindelsene i fraksjon 7.1.1, 7.1.2 og 8.1 (erybraedin A), og 7.2.3.1 og 7.2.3.2 (erybraedin D), se Figur 10.



**Figur 10:** Pterocarpanskjelett med atomnummerering, nummerering for pterocarpaner avviker fra nummereringen for andre flavonoider

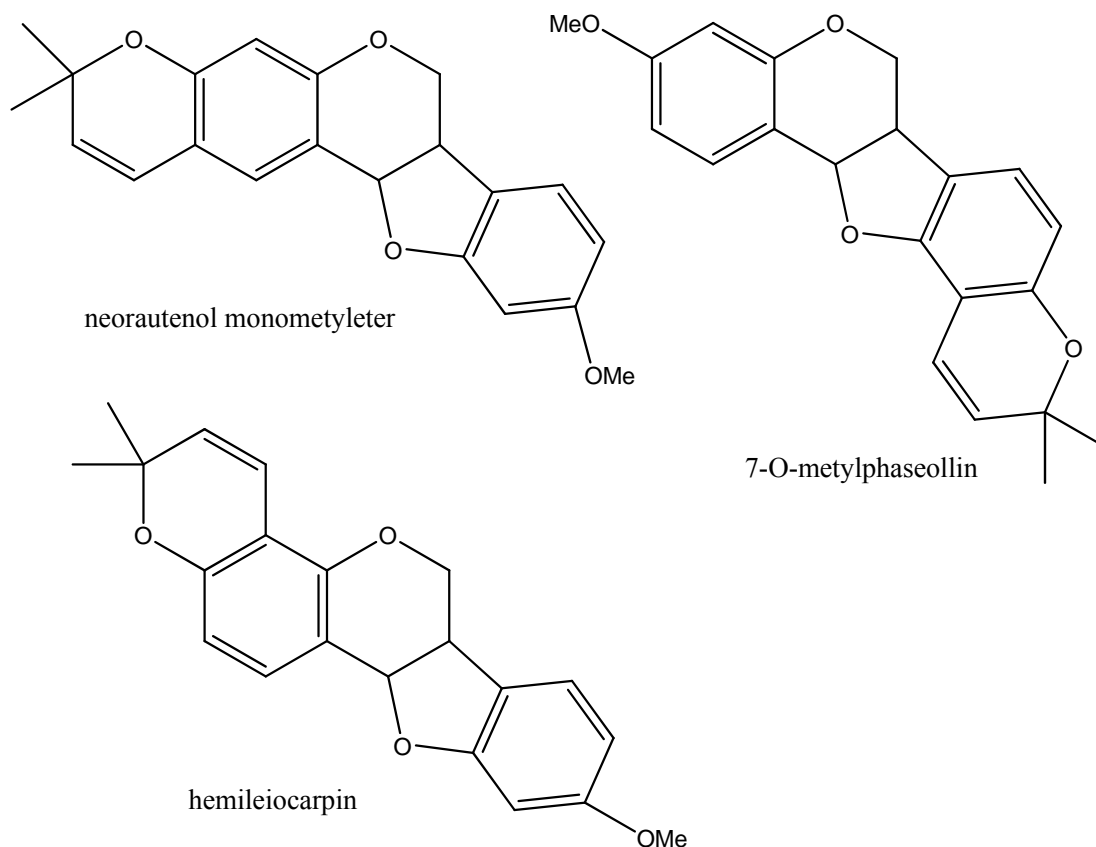
Følgende  $^1\text{H}$  NMR verdier var indikerende for strukturen:

- To dubletter og to singletter i aromatområdet tydet på to ortho-stående aromatiske hydrogen og to para-stående aromatiske hydrogen i molekylet.

- To singletter ved ca. 1,4 ppm som ved integrering ga 6 H-atomer indikerte to nesten identiske metylgrupper fra en syklisert prenylsidekjede. Det fantes ingen singletter som kunne indikere en åpen prenylsidekjede.
- En kraftig singlett ved ca. 4 ppm som ved integrering viste 3 H-atomer indikerte at molekylet inneholdt en aromatisk metoksygruppe.
- To dubletter ved 5,6 og 6,6 ppm tydet på ytterligere to ortho-stående hydrogen som ikke var aromatiske.

På bakgrunn av informasjonen over ble det satt opp forslag til molekylstrukturer som hadde pterocarpanskjelettet, metoksygruppe bundet til den ene aromatiske ringen og var substituert med en syklisert prenylsidekjede på den andre aromatiske ringen. Disse ble søkt etter i Scifinder.

Forbindelser som hadde struktur som stemte overens med forslagene var neorautenol monometyl eter (Brink *et al.* 1974), 7-O-metylphaseollin (Lane *et al.* 1985) og hemileiocarpin (Van Heerden *et al.* 1978), se Figur 11 s.87. Sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR verdier for fraksjon 8.4.2.2, se Tabell 29 s.87, med data for disse tre forbindelsene stemte ikke overens og tydet dermed på at forbindelsen i fraksjon 8.4.2.2 ikke tidligere var identifisert.



**Figur 11:** Molekylstruktur for neorautenol monometyler (Brink *et al.* 1974), 7-O-metykphaseollin (Lane *et al.* 1985) og hemileiocarpin (Van Heerden *et al.* 1978)

7,26, <i>d</i> , 1H, J=8,2 Hz
6,8, <i>s</i> , 1H
6,63, <i>d</i> , 1H, J=9,9 Hz
6,53, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz
6,51, <i>s</i> , 1H
5,67, <i>s</i> , 1H
5,57, <i>d</i> , 1H, J=9,9 Hz
5,43, <i>d</i> , 1H, J=6,9 Hz
4,28, <i>dd</i> , 1H, J=5,1, 11 Hz
3,87, <i>s</i> , 3H
3,65, <i>t</i> , 1H
3,49, <i>t</i> , 1H
1,42, <i>d</i> , 6H, J=2,4 Hz

**Tabell 29:** <sup>1</sup>H NMR verdier for fraksjon 8.4.2.2

For å finne strukturen til forbindelsen måtte den dermed deles opp i ulike strukturelementer for å kunne sammenligne med strukturelementer i referanseforbindelser. Det var vist at skjelettet var substituert med en syklisert prenylsidekjede, men ikke hvilken ring denne satt på og i hvilken

posisjon. For å finne ut av dette ble  $^1\text{H}$  NMR verdier for fraksjonen sammenlignet med verdier for de ulike alternative strukturelementer i litteraturreferanser.

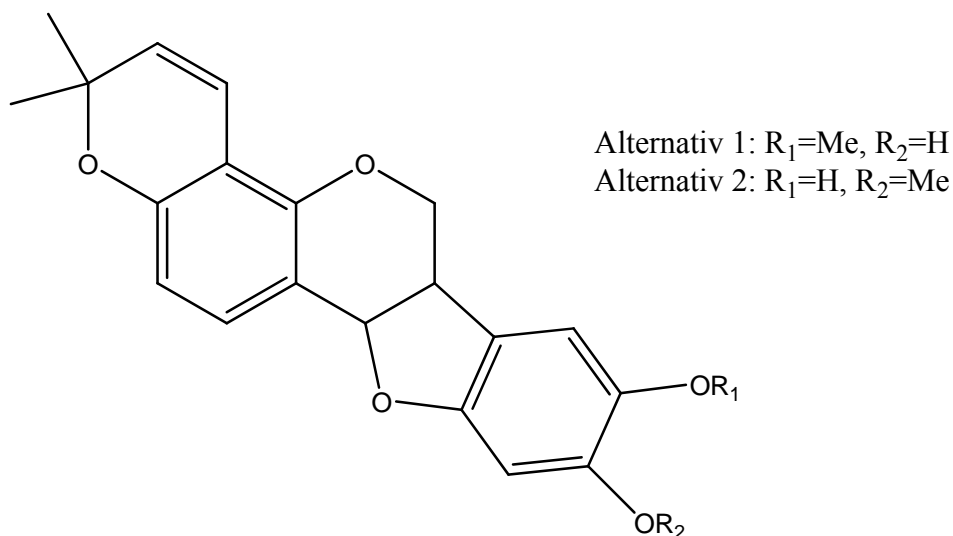
Sammenligning med  $^1\text{H}$  NMR verdier for prenylsubstituert B-ring, enten bundet til karbonatom 8 og 9 som i erybraedin D (Mitscher *et al.* 1988b), eller til 9 og 10 som i folitenol (Tanaka *et al.* 1998) stemte ikke overens og viste at det ikke kunne være B-ringen som er prenylssubstituert i forbindelsen i fraksjon 8.4.2.2.

Deretter ble  $^1\text{H}$  NMR verdiene for fraksjonen sammenlignet med verdier for de to ulike varianter av A-ring substitusjon, bundet til karbonatom 2 og 3 som i neorautenol monometyl eter (Brink *et al.* 1974) eller til 3 og 4 som i shinpterocarpin (Kitagawa *et al.* 1994). Verdiene for den siste typen substitusjon passet godt overens og indikerte at det var denne type substitusjon i forbindelsen.

Denne sammenligningen av verdier viste at forbindelsen i fraksjon 8.4.2.2 sannsynligvis har syklisert prenylsidekjedesubstitusjon bundet til karbonatom 3 og 4 på A-ringen. I shinpterocarpin har A-ringen kun prenylsubstitusjon og siden verdiene passet så godt overens med verdiene fra fraksjonen ble det antatt at metoksygruppen måtte være bundet til B-ringen i forbindelsen i fraksjon 8.4.2.2.

Etter å ha slått fast hvor prenylsidekjeden satt og sett nærmere på signalene i  $^1\text{H}$  NMR spekteret fremkom det at forbindelsen så ut til å måtte ha en substituent til, i tillegg til metoksygruppen og den sykliserte prenylsidekjeden. Dette kom av at det kun var to dubletter i aromatområdet, dette tilsvarer de to aromatiske hydrogenatomene i ortho-posisjon på A-ringen. Hadde det kun vært metoksyldsubstitusjon på B-ringen hadde forbindelsen hatt to ortho-stående aromatiske hydrogen der også. Spekteret hadde to singletter i aromatområdet som tilsvarer to para-stående aromatiske hydrogen, men ingen signaler for metastående aromatiske hydrogen. Det var stor sannsynlighet for at den siste substituenten kunne være en hydroksylgruppe ettersom det fantes en singlett ved 5,67 som ved integrering viste 1 H-atom.

På bakgrunn av arbeidet som var gjort ble det satt opp et foreslag til struktur for forbindelsen i fraksjon 8.4.2.2, se Figur 12 s.89.



**Figur 12:** Molekylstrukturforslag til forbindelsen i fraksjon 8.4.2.2

Begge de foreslåtte strukturene ble søkt etter i Scifinder, men de fantes ikke blant kjente strukturer. Dermed var det med stor sannsynlighet en forbindelse med en tidligere ikke beskrevet struktur som fantes i fraksjon 8.4.2.2.

Den foreslåtte strukturen har svært lik hovedstruktur som hemileiocarpin (Kitagawa *et al.* 1994) og for å bekrefte at denne hovedstrukturen er riktig ble  $^{13}\text{C}$  NMR verdier for fraksjon 8.4.2.2, se Vedlegg 16 s.131 og Tabell 30, sammenlignet med like strukturelementer i hemileiocarpin. Sammenligningen viste at den foreslåtte hovedstrukturen er riktig.

154	110,5
153,9	107,7
151,1	98,1
146,6	78,4
141,0	76,1
130,8	66,6
129,2	56,9
121,6	40,2
116,9	27,8
116,5	27,7
112,3	

**Tabell 30:**  $^{13}\text{C}$  NMR verdier for fraksjon 8.4.2.2

For å angi substitusjonsmønsteret for ring B samt å bekrefte den foreslåtte strukturen ble det utført 2-dimensjonal NMR spektroskopi og massespektrometri på fraksjonen.

### 2-D NMR spektroskopi

Resultatene fra HSQC analysen viste hvilke protoner som koblet med hvilke karbonatomer og gjorde det mulig å angi de kjemiske skiftposisjonene for disse atomene, se Vedlegg 17 s.132 og Tabell 31.

<sup>1</sup> H NMR Verdi	<sup>13</sup> C NMR Verdi
7,26	130,8
6,80	107,7
6,63	116,5
6,53	110,5
6,51	98,1
5,57	129,2
5,43	78,4
4,28	66,6
3,87	56,9
3,65	66,6
3,49	40,2
1,42	27,7
1,42	27,8

**Tabell 31:** HSQC krysstopper i fraksjon 8.4.2.2

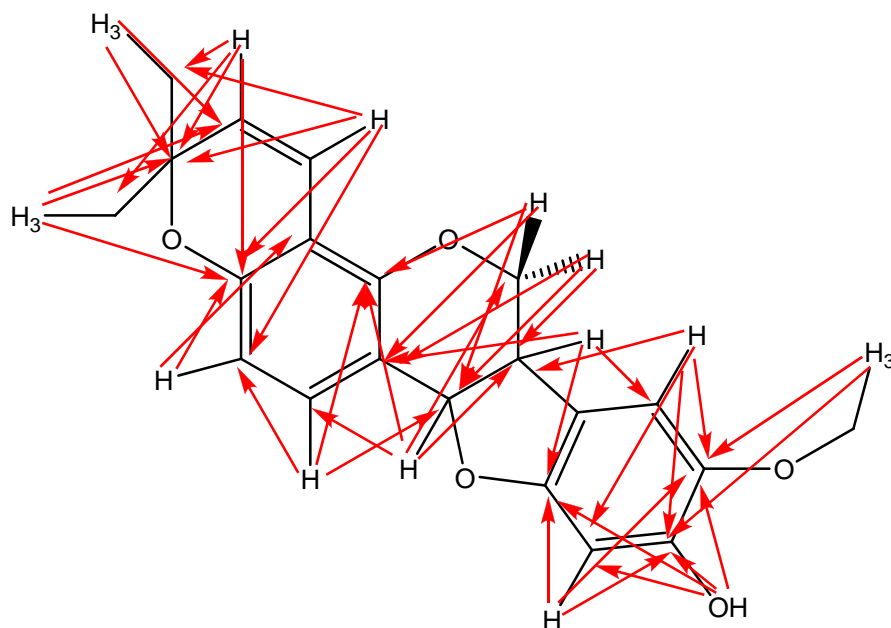
Ut ifra HMBC spekteret er det mulig å angi posisjonen for metoksy- og hydroksylgruppene på B-ringen, se Vedlegg 18 s.132. H-atomet (ppm 5,67) på hydroksylgruppen dannet krysstopp med C-10 og viste derfor at hydroksylgruppen måtte være bundet til C-9, se Tabell 32 s.91. Dette stemmer overens med NMR-verdiene for lignende pterocarpaner med OMe og OH bundet til henholdsvis C-8 og C-9 på B-ringen (Miyase *et al.* 1999). HMBC spekteret bekreftet også det foreslåtte substitusjonsmønsteret for resten av molekylet, for eksempel plassering av H-1 og H-2 på grunn av kobling mellom H-1 og C-11a.



<sup>1</sup> H NMR verdi	<sup>13</sup> C NMR verdi	<sup>1</sup> H NMR verdi	<sup>13</sup> C NMR verdi
7,26	78,4	Forts. 5,57	110,5
	110,5		153,9
	151,1	5,43	40,2
6,80	40,2		66,6
	98,1		112,3
	141,0		130,8
	146,6		151,1
	154,0	4,28	40,2
6,63	27,7		78,4
	27,8		116,9
	76,1		151,1
	110,5	3,87	141,0
	153,9		146,6
6,53	112,3	3,65	78,4
	153,9		116,5
6,51	141,0		151,1
	146,6	3,49	107,7
5,67	98,1		116,9
	141,0		154,0
	146,6	1,42	27,7
	154,0		27,8
5,57	27,7		76,1
	27,8		129,2
	76,1		153,9

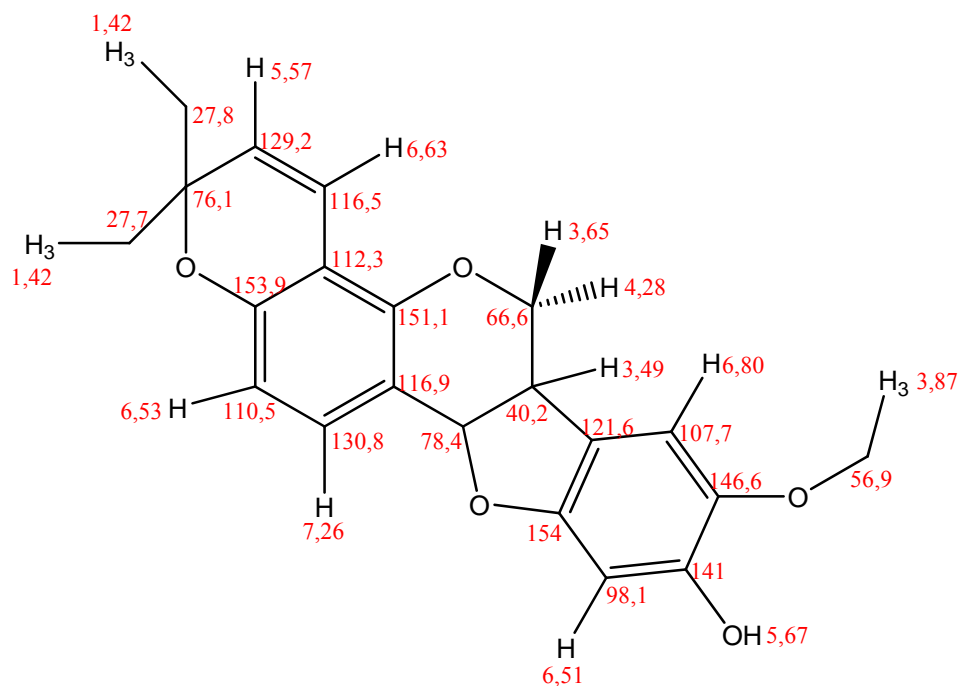
**Tabell 32:** HMBC kryssstopper i fraksjon 8.4.2.2

Informasjon fra HSQC og HMBC analysene viste henholdsvis hvilke karbon og hydrogen som er bundet til hverandre og hvilke som kobler til hverandre på mellom to og fire bindingsavstander, se Figur 13 s.92.



**Figur 13:** Molekylstruktur for forbindelsen i fraksjon 8.4.2.2 med koblinger mellom hydrogen- og karbonatomer

På bakgrunn av disse dataene kunne de kjemiske skiftposisjonene til forbindelsen i fraksjon 8.4.2.2 angis, se Figur 14, og dette er dermed den ukjente forbindelsen isolert i fraksjon 8.4.2.2. Denne forbindelsen har det systematiske navnet 9-hydroksy-8-metoksy-6',6'-dimetylpyrano[2',3':3,4]pterocarpan, et trivial navn er ennå ikke gitt forbindelsen.



**Figur 14:** Molekylstruktur for forbindelsen i fraksjon 8.4.2.2 med kjemiske skift verdier

### *Massespektrometri*

For å bekrefte strukturen ble det utført massespektrometri på forbindelsen. Ut ifra strukturen satt opp på bakgrunn av NMR data skulle forbindelsen ha molekylvekt 352. Dette ble bekreftet av den massespektrometriske analysen, se Vedlegg 19 s.133. I spekteret etter analysen var det også en topp ved masse 337, dette tilsvarer avspaltning av en metylgruppe. Dette er en sannsynlig avspaltning i prenylsidekjeden i molekylet. Det var i tillegg topper ved masse 322 og 307, som tilsvarer avspaltning av henholdsvis metanol, og metyl og metanol. Metanolavspaltning kommer av avspaltning av metoksygruppen.

### **5.1.20 Videre separasjon av fraksjon 11**

For oversikt over den videre fraksjoneringen av fraksjon 11 og fraksjonsvekter, se Flytskjema 5 s.123.

### *Sentrifugalt akselerert TLC*

Fraksjon 11 ble separert og fraksjonert på en normalfase silika TLC plate. Det ble samlet inn fire fraksjoner, 11.1 – 11.4. Det samlede utbyttet etter fraksjoneringen ble 92,4 %.

### *NMR spektroskopi*

De fire fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi.

Fraksjon 11.1 ga et spekter med svake signaler, mye forurensninger og en del fett. Det var ikke klare interessante signaler i dette spekteret.

Fraksjon 11.2 ga et spekter med sterke signaler. Det var i dette spekteret signaler som tydet på at det i fraksjonen fantes forbindelser med samme pterocarpanskjelett som er sett i tidligere fraksjoner. Men det så ut til at fraksjonen inneholdt flere forbindelser i blanding og trengte derfor videre opprensning.

Fraksjon 11.3 ga et lignende spekter som fraksjon 11.2 men inneholdt mer forurensninger enn denne.

Fraksjon 11.4 ga et spekter med veldig svake og uklare signaler. Fraksjonen så ut til å inneholde lite interessante forbindelser og en del ikke-aromatiske komponenter.

### **5.1.21 Videre separasjon av fraksjon 11.2**

- Flytskjema 5

#### *VersaFlash kolonne separasjon*

Fraksjon 11.2 ble separert og fraksjonert på en omvendtfase kolonne. Det ble totalt samlet 48 fraksjoner, på bakgrunn av analytisk TLC ble disse slått sammen til 10 fraksjoner, 11.2.1 – 11.2.10. Utbyttet etter fraksjoneringen ble 150,5 %. Årsaken til at utbyttet ble over 100 % er sannsynligvis at den siste mobilfasen som ble pumpet gjennom kolonnen var ren metanol og den har eluert ut stoffer som har sittet på kolonnen fra tidligere bruk.

#### *NMR spektroskopi*

Alle de ti fraksjonene etter separasjonen ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi.

Fraksjon 11.2.1 ga et spekter som ikke inneholdt noen signaler som var interessante.

Fraksjon 11.2.2 ga et spekter med signaler som tydet på at denne fraksjonen ikke inneholdt den samme forbindelsen som var hovedforbindelsen i fraksjon 11.2. Ut ifra signalene så det ut til at fraksjonen inneholdt to eller flere forbindelser i blanding.

Fraksjon 11.2.3 ga et spekter med tilsvarende signaler som fraksjon 11.2.2 men i dette spekteret var signalene sterkere og støyen mindre på grunn av at denne fraksjonen inneholdt større mengde stoff enn den foregående fraksjonen. Spekteret viste en singlett ved 4 ppm som tydet på innhold av metoksygruppe. Denne var derfor aktuell å jobbe videre med.

Fraksjon 11.2.4 ga et forholdsvis klart spekter med signaler som tydet på at fraksjonen kunne inneholde en forbindelse med samme pterocarpanskjelett som er sett tidligere. Det viste et signal ved ca. 4 ppm som betydde at forbindelsen inneholdt en eller flere metoksygrupper, dette kombinert med at det var relativt lite forurensninger i fraksjonen gjorde denne aktuell å arbeide videre med.

Fraksjon 11.2.5 ga et relativt svakt spekter med signaler som viste at fraksjonen var en kompleks prøve med mange ulike forbindelser, spekteret inneholdt blant annet mange signaler som ble tilskrevet terpenoider.

Fraksjon 11.2.6 ga et lignende spekter som fraksjon 11.2.5. Det viste noe mer antydning til innhold av pterocarpanforbindelser, men var allikevel et komplekst spekter med mange ulike forbindelser.

Fraksjonene 11.2.7, 11.2.8 og 11.2.9 ga spekter som var så like at det var tydelig at de inneholdt samme forbindelse. Signalene tydet på at det stort sett bare var en forbindelse i fraksjonene, altså lite forurensninger, se Vedlegg 20 s.133. De tydet også på at dette var en pterocarpanforbindelse lignende de vi har sett før. Denne informasjonen gjorde at dette var fraksjoner som var interessante å se nærmere på.

Fraksjon 11.2.10 ga et spekter nesten uten signaler, og signalene som var fantes i spekteret var ikke av interesse.

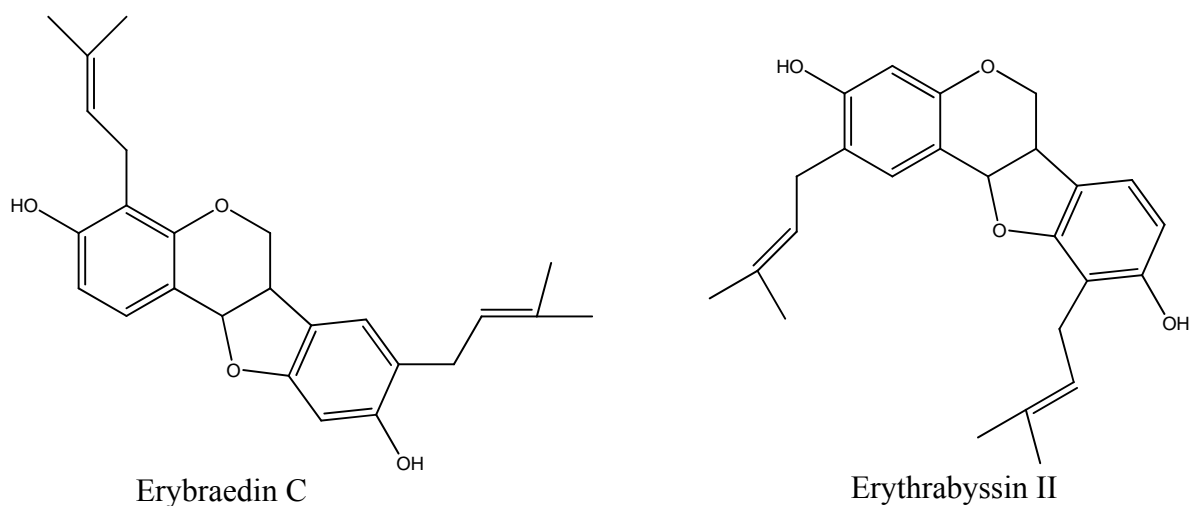
#### **5.1.22 Videre arbeid med fraksjon 11.2.7 – 11.2.9**

Disse tre fraksjonene inneholdt samme forbindelse og ga  $^1\text{H}$  NMR spekter med signaler som var interessante å se nærmere på for å kunne strukturoppklare forbindelsen som var tilstede i disse fraksjonene.

##### *Strukturoppklaring*

Signalene i spekteret hadde gitt indikasjon på at fraksjonene inneholdt lite forurensninger og at forbindelsen som fantes i fraksjonene hadde samme pterocarpanskjelett som sett i tidligere fraksjoner. To kraftige singletter ved ca. 1,8 ppm som tilsvarte til sammen 12 H-atomer tydet på to åpne prenylsidekjedesubstituenten. To singletter og to dubletter i aromatområdet tilsvarende 1 H-atom hver viste at forbindelsen hadde to ortho-stående og to para-stående aromatiske hydrogen, dette ga en indikasjon på hvor prenylsidekjedene måtte være bundet på de aromatiske ringene. Det ble også gått ut ifra at forbindelsen hadde to hydroksylgrupper substituert på de aromatiske ringene, både fordi dette er sannsynlig ifølge biosynteseveien til denne type forbindelser og fordi det i

spekteret til fraksjonene 11.2.7 og 11.2.8 var to singletter rett over 5 ppm som var sannsynlige signaler fra hydroksylgrupper. Det ble tegnet opp to ulike strukturalternativer basert på disse opplysningene. Alternativene ble søkt etter i Scifinder og det viste seg at de tilsvarte to kjente forbindelser, erybraedin C og erythrabyssin II, se Figur 15. Fraksjon 11.2.9 var den største fraksjonen og viste spekteret med de klareste og sterkeste signalene av de tre fraksjonene.  $^1\text{H}$  NMR verdier fra fraksjon 11.2.9 ble derfor sammenlignet med litteraturreferanseverdier for de to kjente strukturene, se Tabell 33 s.97. Sammenligningen viste tydelig at forbindelsen i fraksjonene 11.2.7 – 11.2.9 var erybraedin C.



**Figur 15:** Molekylstruktur for erybraedin C (Mitscher *et al.* 1988a) og erythrabyssin II (Tanaka *et al.* 1998)

Hydrogen	Erythrabyssin II, (Tanaka <i>et al.</i> 1998)	Erybraedin C, (Mitscher <i>et al.</i> 1988a)	Fraksjon 11.2.9, (Vedlegg 20)
H-1	7,25, <i>s</i>	7,27, <i>d</i> , 1H, J=8,1 Hz	7,26, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz
H-2		6,55, <i>d</i> , 1H, J=8,1 Hz	6,55, <i>d</i> , 1H, J=8,4 Hz
H-4	6,41, <i>s</i>		
H-6	3,59, <i>t-like</i> , J=11 Hz	3,43, <i>m</i> , 1H	3,49, <i>m</i> , 1H
H-6	4,20, <i>dd</i> , J=11, 5,1 Hz	4,29, <i>dd</i> , 1H, J=4,8, 10,8 Hz	4,27, <i>dd</i> , 1H, J=4,8, 10,6 Hz
H-6a	3,49, <i>m</i>	3,55, <i>dd</i> , 1H, J=10,8 Hz	3,57, <i>dd</i> , 1H
H-7	6,95, <i>d</i> , J=8,1 Hz	6,95, <i>s</i> , 1H	6,95, <i>s</i> , 1H
H-8	6,37, <i>d</i> , J=8,1 Hz	6,36, <i>s</i> , 1H	6,36, <i>s</i> , 1H
H-11a	5,44, <i>d</i> , J=7,3 Hz	5,47, <i>d</i> , 1H, J=6 Hz	5,46, <i>d</i> , 1H, J=6,7 Hz
H-1'	3,34, <i>d</i> , J=7,3 Hz	3,28, <i>d</i> , 2H, J=7,8 Hz	3,29, <i>d</i> , 1H, J=7,1 Hz
H-2'	5,29, <i>t</i> , J=7,3 Hz	5,29, <i>t</i> , 1H, J=7 Hz	5,30, <i>t</i> , 1H, J=7 Hz
H-2'		5,22, <i>t</i> , 1H, J=7 Hz	5,22, <i>t</i> , 1H, J=7,1 Hz
H-4'	1,81, <i>s</i>	1,68, <i>s</i> , 3H	
H-5'	1,80, <i>s</i>	1,73, <i>s</i> , 3H	1,72, <i>s</i> , 3H
H-1''	3,35, <i>dd</i> , J=13,2, 7,3 Hz	3,40, <i>d</i> , 2H, J=7,8 Hz	3,40, <i>d</i> , 2H, J=7 Hz
H-1''	3,40, <i>dd</i> , J=13,2, 7,3 Hz		
H-2''	5,34, <i>t</i> , J=7,3 Hz		
H-4''	1,79, <i>s</i>	1,78, <i>s</i> , 3H	1,79, <i>s</i> , 9H
H-5''	1,75, <i>s</i>	1,80, <i>s</i> , 3H	
OH		5,24, <i>s</i> , 1H	
OH		5,43, <i>s</i> , 1H	

**Tabell 33:** Sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR verdier for fraksjon 11.2.9, erybraedin C og erythrabyssin II

Siden fraksjonene 11.2.7 – 11.2.9 alle inneholdt samme forbindelse og lite forurensninger ble disse slått sammen til en fraksjon, 11.2.(7-9). Denne fraksjonen ble undersøkt med flere ulike typer NMR spektroskopi.

### *NMR spektroskopi*

Den sammenslåtte fraksjonen ble analysert med  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY og APT spektroskopi.

Fraksjonens  $^{13}\text{C}$  NMR verdier, se Vedlegg 21 s.134, ble sammenlignet med verdiene til erybraedin C for å bekrefte at det var denne forbindelsen som fantes i fraksjonen, se Tabell 34 s.98. Denne sammenligningen ga en ytterligere bekreftelse på at forbindelsen faktisk var erybraedin C.

Erybraedin C, (Mitscher <i>et al.</i> 1988a)	Fraksjon 11.2.(7-9), (Vedlegg 21)
17,70	17,89
22,21	22,40
25,58	25,82
25,66	
29,04	29,46
39,48	39,66
66,70	66,87
79,00	79,07
98,33	98,49
109,61	109,75
112,30	112,45
115,06	114,93
118,89	118,84
119,08	119,04
121,67	121,64
122,16	122,16
125,11	125,19
129,06	129,18
133,98	
134,05	134,39
153,85	153,81
154,81	155,046
155,36	155,57
158,59	

**Tabell 34:** Sammenligning av  $^{13}\text{C}$  NMR verdier for fraksjon 11.2.(7-9) og erybraedin C

COSY spekteret viser koblinger mellom ulike hydrogen. Spekteret fra fraksjon 11.2.(7-9) viste forventede koblinger, se Vedlegg 22 s.134. Det viste kobling mellom dubletten ved 7,26 ppm og dubletten ved 6,55 ppm, mellom tripletten ved 5,22 ppm og dubletten ved 3,29 ppm og mellom tripletten ved 5,30 ppm og dubletten ved 3,40 ppm.

APT spekteret viste topper som forventet ut ifra strukturen til erybraedin C, se Vedlegg 23 s.135. Primære og tertiære karbonatomer ga positive signaler og sekundære og kvaternære karbonatomer ga negative signaler.



### *Massespektrometri*

For å ytterligere bekrefte at forbindelsen i fraksjonene var erybraedin C ble den sammenslåtte fraksjonen massespektrometrisk analysert på LC/MS-apparat. Spekteret fra analysen viste en topp med masse 393, dette stemmer overens med molekylvekten til erybraedin C, se Vedlegg 30 s.140.

#### *5.1.22.1 Erybraedin C*

Erybraedin C er et isoflavonoid og tilhører undergruppen pterocarpaner. Forbindelsen ble første gang isolert fra røttene til planten *Erythrina mildbraedii* (Mitscher *et al.* 1988a). I denne studien ble det også vist at forbindelsen hadde antimikrobiell aktivitet mot *Staphylococcus aureus* og *Mycobacterium smegmatis*, den viste ingen effekt mot *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* eller *Pseudomonas aeruginosa*.

Erybraedin C ble senere isolert også fra rotbarken til planten *Erythrina eriotricha* (Nkengfack *et al.* 1995). I denne studien ble også forbindelsens antimikrobielle aktivitet undersøkt. De viste at erybraedin C hadde en MIC verdi på 12,8 µg/ml mot *S. aureus*, i den samme studien viste forbindelsen ingen aktivitet mot *E. coli*.

Erybraedin C har også blitt isolert fra planter som ikke tilhører *Erythrina*-slekten. Den har blitt isolert fra planten *Bituminaria morisiana* som hovedkomponent i det tørkede overjordiske materialet fra denne planten. I samme studien ble forbindelsen også isolert fra planten *Bituminaria bituminosa*. (Pistelli *et al.* 2003)

Erybraedin C isolert fra planten *Psoralea morisiana* viste i en studie kraftig antioksidierende aktivitet, og aktivitet som radikalscavenger. I konsentrasjonen som ga aktivitet viste ikke forbindelsen toksisk effekt. (Rosa *et al.* 2005)

Erybraedin C isolert fra *B. bituminosa* ble i en studie vist å ha anticlastogen effekt når mitomycin C og bleomycin ble brukt som referanse-clastogener (Maurich *et al.* 2004).

Erybraedin C isolert fra *B. morisiana* viste i en senere studie moderat cytotoksisitet mot KB cancerceller og Jurkat T-celler, denne cytotoksisiteten så ut til å være relatert til indusering av nekrose (Cottiglia *et al.* 2005).

Den seneste studien som er utført på erybraedin C viste at forbindelsen isolert fra *B. bituminosa* induerte doseavhengig cytotoksisitet og dose- og tidsavhengig apoptose i to humane kolon adenocarcinomcellelinjer, HT29 (LD<sub>50</sub> 1,94 µg/ml) og LoVo (LD<sub>50</sub> 1,73 µg/ml) (Maurich *et al.* 2006).

Søk i tilgjengelige akademiske databaser viste at erybraedin C ikke er blitt isolert fra planten *Erythrina senegalensis* tidligere, isoleringen av forbindelsen i denne oppgaven er dermed det første beskrevne tilfellet fra denne planten.

#### Bioassay

Den sammenslåtte fraksjon 11.2.(7-9) ble testet for 15-lipoksygenasehemming ved fire ulike konsentrasjoner, se Tabell 35.

Konsentrasjon	Grad av hemming
6,25 µg/ml	9,7 ± 5,4 %
12,5 µg/ml	37,9 ± 7,8 %
25 µg/ml	72,6 ± 7,0 %
50 µg/ml	94,2 ± 2,0 %

**Tabell 35:** 15-LO test på fraksjon 11.2.(7-9)

På bakgrunn av disse tallene ble IC<sub>50</sub> verdien til fraksjonen beregnet til 15,9 ± 2,3 µg/ml. Testen viste at fraksjonen ga en høy grad av hemming.

Adenosin deaminase (ADA) hemming ble testet på fraksjonen ved to ulike konsentrasjoner, se Tabell 36.

Konsentrasjon	Grad av hemming
25 µg/ml	1,0 ± 2,9 %
50 µg/ml	2,3 ± 4,1 %

**Tabell 36:** ADA test på fraksjon 11.2.(7-9)

Fraksjonen var tilnærmet uaktiv som ADA-hemmer.

Toksisitet av fraksjonen ble testet ved Brine Shrimp lethality assay ved to ulike konsentrasjoner, se Tabell 37 s.101.

Konsentrasjon	Grad av overlevelse
25 µg/ml	36,7 %
50 µg/ml	10,0 %

**Tabell 37:** Brine Shrimp test på fraksjon 11.2.(7-9)

Tallene som lå til grunn for disse verdiene var sprikende og ble derfor ikke anvendt til å beregne  $LC_{50}$  verdien til fraksjonen. Men verdiene viste at fraksjonen ga nedsatt overlevelse i forhold til blankprøve, og at  $LC_{50}$  verdien var  $<25$  µg/ml.

Fraksjon 11.2.(7-9) ble antimikrobielt testet. Som nevnt tidligere i oppgaven kunne ikke resultatene fra testing mot *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Escherichia coli* anvendes.

Hovedkomponenten i fraksjonen, som var erybraedin C, viste god hemming av vekst av *Staphylococcus aureus*, se Vedlegg 32 s.142. Dette stemmer godt overens med tidligere antimikrobielle studier gjort på erybraedin C.

### 5.1.23 Videre separasjon av fraksjon 11.2.3

- Flytskjema 5

#### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 11.2.3 ble separert og fraksjonert på en omvendtfase kolonne. Fraksjoner ble samlet inn på bakgrunn av kromatogrammet. Det ble totalt samlet inn fem fraksjoner, 11.2.3.1 – 11.2.3.5. Disse ga et samlet utbytte på 70,3 %.

#### *NMR spektroskopi*

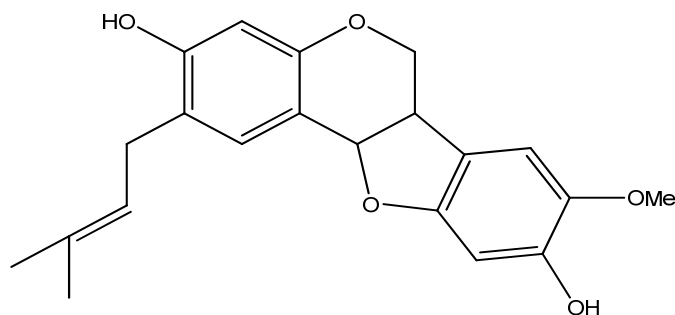
Alle de fem fraksjonene ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi.

Fraksjon 11.2.3.1 ga et spekter med få og svake signaler, og ingen av signalene indikerte at fraksjonen inneholdt interessante forbindelser.

Fraksjon 11.2.3.2 ga et spekter med klare signaler. Signalene tydet på at fraksjonen inneholdt en forbindelse som ligner på erybraedin A som var funnet i tidligere fraksjoner. Men ved sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR verdier viste det seg at forskjellen var for stor til at forbindelsen i fraksjonen kunne være erybraedin A. Men fraksjonen inneholdt dessverre kun en liten mengde prøve og gjorde dermed at det ikke var mulighet for videre undersøker av denne.

Fraksjon 11.2.3.3 ga et relativt klart spekter, men med mange signaler. Signalene tydet på at fraksjonen inneholdt samme forbindelse som i fraksjon 11.2.3.2 i tillegg til minst en annen forbindelse. Siden denne fraksjonen inneholdt to eller flere forbindelser ville det vært nødvendig å rense denne videre ved nærmere undersøkelse av de ulike forbindelsene. Den lille mengden stoff som fantes i fraksjonen vanskeliggjorde videre arbeid med fraksjonen.

Fraksjonene 11.2.3.4 og 11.2.3.5 ga spektre med like signaler som viste at disse inneholdt samme forbindelse, se Vedlegg 24-25 s.135-136. Spektrene hadde klare signaler og relativt lite støy til tross for at fraksjonene inneholdt små mengder stoff. På bakgrunn av mengden signaler i spektrene så fraksjonene ut til å inneholde kun en forbindelse. Signalene fra 3-6 ppm indikerte at forbindelsen i fraksjonene hadde pterocarpanskjelett, den kraftige singletten ved 4 ppm viste at forbindelsen inneholdt metoksygruppe, integrering av signalet ga 3 H-atomer, altså var det en metoksygruppe i forbindelsen. En singlett ved 1,8 ppm som ved integrering ga 6 H-atomer viste at forbindelsen inneholdt en åpen prenylsidekjede. Spektrene inneholdt ikke signaler for en syklisert prenylsidekjede, eller enda en åpen prenylsidekjede, dette indikerte at forbindelsen kun hadde en sidekjede. Fire singletter i aromatområdet viste at forbindelsen inneholdt fire aromatiske para-stående hydrogenatomer. På bakgrunn av informasjonen over ble det satt opp tre forslag til struktur for forbindelsen, to av disse var ikke kjente strukturer tidligere beskrevet, den tredje var forbindelsen eryvarin K, se Figur 16 s.103.  $^1\text{H}$  NMR verdier for fraksjon 11.2.3.4 ble sammenlignet med litteraturreferanseverdier for Eryvarin K, se Tabell 38 s.103. Denne sammenligningen av verdier viste tydelig at forbindelsen i fraksjon 11.2.3.4 og 11.2.3.5 var eryvarin K.



Eryvarin K

**Figur 16:** Molekylstruktur for eryvarin K (Tanaka *et al.* 2003)

Hydrogen	Eryvarin K, (Tanaka <i>et al.</i> 2003)	Fraksjon 11.2.3.4, (Vedlegg 24)
H-1	7,24, <i>s</i> , 1H,	7,24, <i>s</i> , 1H
H-4	6,41, <i>s</i> , 1H	6,40, <i>s</i> , 1H
H-6	3,61, <i>t-like</i> , 1H, J=11 Hz	3,61, <i>t-like</i> , 1H, J=10,9 Hz
H-6	4,22, <i>dd</i> , 1H, J=11, 5,1 Hz	4,21, <i>dd</i> , 1H, J=10,9, 4,4 Hz
H-6a	3,48, <i>m</i> , 1H	3,49, <i>m</i> , 1H
H-7	6,79, <i>s</i> , 1H	6,79, <i>s</i> , 1H
H-10	6,52, <i>s</i> , 1H	6,52, <i>s</i> , 1H
H-11a	5,43, <i>d</i> , 1H, J=6,6 Hz	5,43, <i>d</i> , 1H, J=6,8 Hz
H-OMe	3,87, <i>s</i> , 3H	3,86, <i>s</i> , 3H
H-1'	3,33, <i>d</i> , 2H, J=7,3 Hz	3,33, <i>d</i> , 2H, J=7,1 Hz
H-2'	5,32, <i>t</i> , 1H, J=7,3 Hz	5,31, <i>t</i> , 1H
H-4'	1,79, <i>s</i> , 3H	1,79, <i>s</i> , 3H
H-5'	1,78, <i>s</i> , 3H	1,78, <i>s</i> , 3H
H-OH	5,27, <i>s</i> , 1H	5,24, <i>s</i> , 1H
H-OH	5,68, <i>s</i> , 1H	5,67, <i>s</i> , 1H

**Tabell 38:** Sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR verdier for fraksjon 11.2.3.4 og eryvarin K

### 5.1.23.1 Eryvarin K

Eryvarin K er et isoflavonoid og tilhører undergruppen pterocarpaner. Forbindelsen ble første gang isolert fra røttene til planten *Erythrina variegata* (Tanaka *et al.* 2003). I den samme studien ble det også vist at eryvarin K ikke hadde antimikrobiell aktivitet mot methicillin resistente *Staphylococcus aureus*.

Et søk i tilgjengelige akademiske databaser vist at eryvarin K kun er isolert den ene gangen og bare fra den planten. Dermed er isoleringen av forbindelsen fra *Erythrina senegalensis* i denne oppgangen første gang eryvarin K blir isolert fra denne planten.

#### **5.1.24 Videre separasjon av fraksjon 11.2.4**

- Flytskjema 5

##### *Preparativ HPLC*

Fraksjon 11.2.4 ble separert og fraksjonert på en omvendt fase kolonne. Kromatogrammet fra fraksjoneringen viste kun en absorbanstopp, og det ble dermed bare samlet en fraksjon, 11.2.4.1. Utbyttet etter fraksjoneringen var ikke mulig å beregne siden den nye fraksjonen viste minusvekt.

##### *NMR spektroskopi*

Fraksjonen ble analysert med  $^1\text{H}$  NMR spektroskopi, se Vedlegg 27 s.137. Den ga et spekter med relativt mye støy på grunn av liten mengde stoff, men hadde relativt klare signaler. Ut ifra signalene så det ut til at fraksjonen kun inneholdt en forbindelse og ved sammenligning viste det seg å være den samme som i fraksjonene 11.2.3.4 og 11.2.3.5, altså eryvarin K.

#### **5.1.25 Videre arbeid med fraksjonene 11.2.3.4, 11.2.3.5 og 11.2.4.1**

Sammenligning av  $^1\text{H}$  NMR spektrene til disse fraksjonene hadde vist at de inneholdt samme forbindelse og sammenligning med litteraturreferanseverdier at denne forbindelsen var eryvarin K. På bakgrunn av dette ble fraksjonene slått sammen til en fraksjon, denne ble kalt 11.2.3,4-k.

##### *NMR spektroskopi*

Den nye sammenslåtte fraksjonen ble analysert med  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopi, se Vedlegg 26 s.136. Verdiene ble sammenlignet med litteraturreferanseverdier for eryvarin K for å få ytterligere bekreftelse på at det var denne forbindelsen som fantes i fraksjonen, se Tabell 39 s.105. Denne sammenligningen ga en ytterligere bekreftelse på at forbindelsen i fraksjonen var eryvarin K.

Karbon	Eryvarin K, (Tanaka <i>et al.</i> 2003)	Fraksjon 11.2.3,4-k, (Vedlegg 26)
1	131,9	131,9
2	121,0	121,1
3	155,7	155,7
4	104,0	103,9
4a	155,0	155,0
6	66,5	66,6
6a	40,3	40,4
6b	117,0	117,0
7	107,7	107,8
8	141,1	141,1
9	146,6	146,6
10	98,1	98,1
10a	153,9	153,9
11a	78,2	78,2
11b	112,3	112,3
1'	29,3	29,3
2'	121,8	121,9
3'	135,0	134,9
4'	17,9	17,9
5'	25,8	25,8
8-OMe	56,9	57,0

**Tabell 39:** Sammenligning av  $^{13}\text{C}$  NMR verdier for fraksjon 11.2.3,4-k og eryvarin K

### Massespektrometri

For å bekrefte molekylvekten til forbindelsen i fraksjon 11.2.3,4-k ble fraksjonen massespektrometrisk analysert på LC/MS-apparat. Analysen viste en topp med masse 355, dette stemmer med molekylvekten til eryvarin K og ga en ytterligere bekreftelse på at det var denne forbindelsen som fantes i fraksjonen, se Vedlegg 31 s.141.

### Bioassay

Den sammenslåtte fraksjonen 11.2.3,4-k ble testet for 15-lipoksygenasehemming ved to konsentrasjoner, se Tabell 40.

Konsentrasjon	Grad av hemming
12,5 µg/ml	30,8 ± 6,9 %
25 µg/ml	46,9 ± 10,7 %

**Tabell 40:** 15-LO test på fraksjon 11.2.3,4-k

På bakgrunn av disse tallene har fraksjonen en  $IC_{50}$  verdi på rett over 25  $\mu\text{g/ml}$ , som viser at fraksjonen har en relativt høy grad av hemming.

Fraksjonen ble også antimikrobielt testet, det vil si antifungal- og antibakterielltest. Som nevnt tidligere i oppgaven kunne ikke resultatene fra testing mot *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Escherichia coli* brukes. Testen mot *Staphylococcus aureus* viste at hovedkomponenten i fraksjonen har sterkt hemmende aktivitet på denne bakterien, se Vedlegg 32 s.142.



## 6 Etnofarmakologiske studier

### 6.1 Innledning

I samfunnet vårt er det en stadig jakt på nye og forbedrede legemidler. Etter hvert som forskning og teknologi øker kunnskapen om sykdommer og bekjempelsen av disse, dukker også behovet opp for stadig nye legemidler. Det er en voksende interesse for naturstoffer i den vestlige verden, både på grunn av deres medisinske anvendelse og ved at de kan danne utgangspunktet for fremstilling av andre medisinsk anvendbare substanser. Ca. 25 % av alle legemidler som foreskrives i verden kommer fra planter, og av de 252 legemidlene som WHO regner som essensielle er 11 % av planteopprinnelse og et betydelig antall er syntetiske forbindelser utviklet med naturstoff som utgangspunkt (Rates 2001). Ca. 2/3 av alle "investigational new drugs" fra 1986 til 2006 er naturstoffer, naturstoffavledet eller syntetiske substanser med struktur eller farmakofor hentet fra naturstoffer (Newman og Cragg 2007). I naturen finnes det mange uoppdagede ressurser, det store flertall av planter er ikke kjemisk eller farmakologisk undersøkt ennå. Dette gir mange muligheter for oppdagelse av nye legemiddelsubstanser.

Ved søk etter nye legemidler kan det benyttes mange ulike metoder. Man kan foreta tilfeldige eller målrettede søk. De målrettede søkene kan være basert på ulike grunnlag, vanligst er fylogenetisk basert, økologisk basert eller etnofarmakologisk basert. I denne oppgaven ble det utført studier som er en del av et etnofarmakologisk basert målrettet søk etter nye legemidler.

## 6.2 Etnofarmakologi

Etnofarmakologi som eget forskningsfelt har relativt kort fartstid og termen ble først brukt i 1967 i tittelen til en bok om hallusinogener. Etnofarmakologi er i dag definert som et ”tverrfaglig vitenskaplig studium av biologisk aktive forbindelser som tradisjonelt har vært benyttet eller kjent av mennesker til behandling av sykdommer” (Heinrich *et al.* 2004). De etnofarmakologiske studiene som ble utført i Mali er en del av prosjektet ”Medicinal plants from Mali – Ethnopharmacology, chemistry and biological activity” som er et inter-universitets samarbeid mellom University of Bamako/DMT (Department of Traditional Medicine) og Universitetet i Oslo. De etnofarmakologiske studiene går ut på intervjuer med medisinmenn (utøvere av tradisjonell medisin) om deres bruk av ulike planter, hvilke planter de bruker ved hvilke indikasjoner og hvordan disse tilberedes, innsamling av plantemateriale og bearbeidelse av dette på laboratoriet i ettertid.

## 6.3 Mali



**Figur 17:** Mali (Virginia 2002)

Mali ligger i Vest-Afrika, sør for Algerie og øst for Mauritania og er en tidligere fransk koloni som ble uavhengig i 1960. Landet kan deles i tre hovedområder: Området i nord som er en del av Sahara-ørkenen, den sentrale regionen som består av Sahel (et tørt slettelandskap som grenser mot ørkenen – såkalt halvørken) og den sydlige delen med fuktig savanneklima. Det er i denne sydlige landsdelen landets to elver, Senegal og Niger befinner seg. Elven Niger er selve livsnerven i Mali, og de fleste

innbyggerne i landet bor langs denne elven og bruker den som drikkevannskilde, matkilde og som viktigste transportvei.

Ifølge FN er Mali et av verdens aller fattigste land. Det har opplevd en viss økonomisk vekst på 1990-tallet (4-5 %), men fortsatt (2003) lever over 70 % av befolkningen på mindre enn 1 USD (fattigdomsgrensen) om dagen. Mali har mottatt bistand fra Norge siden 1970-tallet. I 2004 var bistanden på 50,5 millioner kroner (Wikipedia 2007). Mali har 11,7 millioner innbyggere (juli 2006, estimert), med en gjennomsnittsalder på 15,8 år, forventet levealder på 49 år og spedbarnsdødelighet på nesten 12 % (2003). Omtrent 10 % av befolkningen er nomader. Drøyt halvparten av befolkningen eldre enn 15 år var analfabeter i 2003. Omtrent 90 % av befolkningen er muslimer, men det finnes også en kristen minoritet. Elementer fra tradisjonelle afrikanske religioner blandes med disse religionene, og har stor innflytelse på tenke- og væremåten til innbyggerne.

De dominerende infeksjose sykdommene med høy grad av risiko i Mali er bakteriell og protozoell diaré, hepatitt A, tyfoidfeber, malaria, schistosomiasis og meningokokkmeningitt (CIA 2007).

#### **6.4 Tradisjonell medisin i Mali**

Majoriteten av befolkningen i Mali er avhengig av tradisjonell medisin ved behandling av sykdommer, dette kommer både av at tradisjonell medisin er en stor del av kulturen i Mali og av at vestlige medisiner er dyre og ikke lett tilgjengelige. Tradisjonell medisin (TM) innbefatter bruk av stoffer (fra urter, planter, dyr og mineralelementer), doseringer og praksiser basert på sosiokulturelle normer og religiøs tro i tillegg til opplevde erfaringer og observasjoner. Denne kunnskapen overføres fra generasjon til generasjon i muntlig eller skriftlig form (Inngjerdingen *et al.* 2004).

Mali ønsker å promotere TM og vil med det oppnå to formål: å inkludere tradisjonelle helseaktiviteter i den nasjonale helseplanen og å aktualisere lokal produksjon av medisiner fra lokalt tilgjengelige naturressurser. Disse aktivitetene koordineres av DMT (Department of Traditional Medicine) som inngår i the National Public Health Research Institute som igjen ligger under Ministry of Health, Bamako, Mali. Integrering av TM i nasjonale helsesystemer krever samarbeid mellom utøvere av tradisjonell medisin (UTM) og utøvere av konvensjonell medisin (UKM). I Mali er en UTM definert som ”en person som er anerkjent av medlemmene av sitt samfunn som

kvalifisert til å praktisere tradisjonell medisin”. UTM finnes i både urbane og landlige strøk. En UTM som vil bli offisielt akseptert av DMT må evalueres i henhold til antall pasienter han behandler, hvilke resultater som oppnås og tilfeller der det ikke foreligger noe resultat av behandlingen. Denne evalueringen utføres av UKM i samarbeid med DMT. I Mali finnes det 51 lokalforeninger for UTM, disse har etablert et nasjonalt byrå som samarbeider med DMT og organiserer International African Traditional Medicine Week (SIMTA) en gang i året. Dette er et forum for utveksling av erfaringer og ideer mellom UTM i den Vestafrikanske subregionen. (Diallo *et al.* 2003)

Hovedaktivitetene ved DMT består i å registrere UTM og medisinplanter i tillegg til forskning på og utvikling av Improved Traditional Medicines (ITM) fra lokale planter (Inngjerdingen *et al.* 2004). ITM er definert som medisin produsert fra planter ved å tilsette kjemiske substanser for å oppnå farmasøytiske formuleringer som kapsler, oppløsning og salver. ITM er et billigere og lettere tilgjengelig alternativ til konvensjonell medisin (Bah *et al.* 2007). Det er tre steg som ligger bak produksjonen av ITM. Først utføres det en etnobotanisk undersøkelse, som består av intervjuer med medisinmenn om deres bruk av planter. Man kan enten velge å ta utgangspunkt i en bestemt plante eller en indikasjon ved utførelsen av denne undersøkelsen. Neste steg er å jobbe med plantematerialet på laboratoriet, man undersøker biologisk aktivitet, toksisitet, kjemi og standardisering. Siste steget består i å bestemme dosering, formulering og pris på produktet. DMT har til nå utviklet syv ITM som er i salg, og to som det for tiden arbeides med å gjøre klare for salg.

## 6.5 Resultater

Feltarbeidet i Mali ble utført mars-april 2007 i to ulike geografiske områder av landet, dette var interessant for å se om svarene vi fikk samsvarte uavhengig av geografi. Arbeidet ble ledet av professor Drissa Diallo og det var også han som fungerte som intervjuer og oversetter.

Medisinmennene ble spurt om deres bruk av fire ulike planter: *Erythrina senegalensis*, *Opilia celtidifolia*, *Biophytum petersianum*, *Combretum glutinosum* og *Syzygium guineense*. I denne oppgaven presenteres kun resultatene for *E. senegalensis*, resultatene for det første feltarbeidet er gitt i Tabell 41 s.113 og for det andre i Tabell 42 s.115.

### Definisjoner:

Dekokt: Plantematerialet trekkes i kokende vann

Macerat: Plantematerialet trekkes i vann (ikke oppvarmet) over lengre tid

I noen tilfeller stemmer ikke antall medisinmenn som bruker ulike plantedeler overens med antall medisinmenn som bruker planten ved den aktuelle indikasjonen, dette kommer av at noen medisinmenn oppgir å bruke planten på ulik måte ved samme indikasjon.

### Feltarbeid 1:

Det første feltarbeidet ble utført i Dioila-området sørøst for hovedstaden Bamako. 37 medisinmenn, av disse tre kvinnelige, ble intervjuet. En av medisinmennene brukte ikke *E. senegalensis* i sin praksis. Resultatene viste at dette er en plante som brukes ved veldig mange indikasjoner, mange av disse er kun nevnt av en medisinmann, se Tabell 41. Dette kan komme av at de ulike medisinmennene har ulike navn på samme type sykdom. Noen indikasjoner ble nevnt av flere medisinmenn, de vanligste var amenorrhea, malaria og ikterus, se Figur 18 s.114. Det var også vanlig å bruke dekokt av ulike deler av planten som styrkedrikk, særlig til barn.

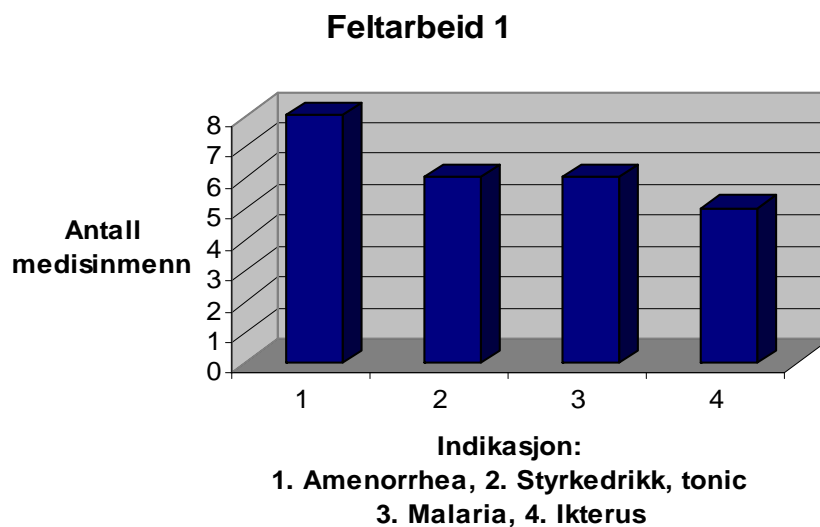
Lokale navn på *E. senegalensis*:

N'Té	Surudolen	Muso-N'Tièmè
N'Tièmè	Turudolen	Zemen
Furudolen	Siridolen	Zemeba

Indikasjon	Antall healere	Del av planten som benyttes	Antall healere	Formulering
Amenorrhea	8	Rot Rotbark Blomst Blader	3 1 4 1	Knust/dekott/pulver, drikkes Dekott, drikkes Dekott/pulver, drikkes Dekott, drikkes og vaske lokalt
Styrkedrikk	6	Blader Rot  Stammebark Blomster, rot og stammebark	1 4  2 1	Dekott, vaske kroppen Dekott/pulver, vaske kroppen/drikkes Dekott, vaske kroppen/drikkes Dekott, vaske kroppen
Malaria	6	Rotbark Rot Stammebark	1 3 2	Pulver, drikkes Pulver/macerat, drikkes Dekott, drikkes
Ikterus	5	Stammebark Rotbark Blader, rot og stammebark Rot	2 2 1 1	Macerat/dekott, drikkes Macerat, drikkes Dekott, drikkes Dekott, drikkes
Blemmer på kroppen(Bubbles)	3	Rot  Blader	1  2	Dekott, drikkes og vaske kroppen Dekott, drikkes og vaske kroppen
Nevrologisk malaria	2	Stammebark	2	Røkelse, inhaleres eller Pulver/dekott, drikkes og vaske kroppen
Feber	2	Blader, rot og stammebark Rot	1 1	Dekott, drikkes Pulver, drikkes
Dysmenorrhea	2	Blader  Stammebark Rotbark	1  2 1	Dekott, drikkes og vaske kroppen Dekott/macerat, drikk og vaske kroppen Macerat, drikkes
Kraftig menstruasjonsblødning	2	Stammebark Blomst	1 1	Dekott, drikkes og vaske lokalt Pulver, drikkes
Magesmerter	2	Blader Stammebark	2 1	Dekott, drikkes Pulver, drikkes
Psykose	2	Blader  Blader og stammebark	1  1	Dekott, vaske kroppen og røkelse Dekott, dampbad og vaske kroppen
Anuri	2	Rotbark Stammebark	1 1	Macerat, drikkes Macerat(kortvarig), drikkes
Urinveisinfeksjon	2	Rot	1	Dekott, drikkes

		Stammebark	1	Dekokt, drikkes
Infeksjon	2	Rotbark	2	Macerat, drikkes
		Stammebark	1	Macerat, drikkes
Prevensjon	2	Frø	2	Spises hele
Nightdisease hos barn(feber, søvnløshet, gråting)	1	Stammebark	1	Macerat, drikkes og vaske kroppen
Spontanabort grunnet infeksjon, forebyggelse	1	Rot	1	Pulver, spises
Candidiasis	1	Stammebark	1	Dekokt, drikkes og vaske lokalt
Pneumoni	1	Blader	1	Dekokt, dampbad og vaske brystet
Brysthinnebetennelse	1	Stammebark	1	Skummet som dannes ved risting med vann smøres på brystet.
Astma	1	Blomst	1	Pulver, drikkes
Oppkast ved ikterus	1	Blader og stammebark	1	Dekokt, drikkes og vaske kroppen
Betennelse i lever/leverproblemer		Rot	2	Dekokt/pulver, drikkes
Malaria med forstoppelse og ryggsmarter	1	Rot	1	Dekokt, drikkes og vaske kroppen
Magetrøbbel/lidelser	1	Rot	1	Dekokt, drikkes
Magesår	1	Stammebark	1	Macerat, drikkes
Forstoppelse	1	Blader og rot	1	Dekokt, drikkes
Svakhet og diaré	1	Stammebark	1	Dekokt, drikkes
Indre sår	1	Rot	1	Støtes med melk, drikkes
Svimmelhet	1	Blader	1	Dekokt, drikkes, dampbad og vaske kroppen
Inflammasjon	1	Stammebark	1	Støtes/pulver, påføres lokalt
Tannrens	1	Små kvister	1	Tygges
Slangebitt	1	Rot	1	Dekokt, vaske lokalt
Seksuell tonic	1	Blader	1	Dekokt, drikkes
Ødem	1	Rot	1	Dekokt/pulver, drikkes og vaske kroppen
Sekundær sterilitet	1	Blader	1	Dekokt, drikkes
Sår i munnen hos barn (moren som behandles)	1	Stammebark	1	Pulver, drikkes

**Tabell 41:** Feltarbeid 1, resultater



**Figur 18:** Feltarbeid 1, vanligste indikasjoner

### **Feltarbeid 2:**

Det andre feltarbeidet ble utført i Koutiala som ligger øst for hovedstaden Bamako. 18 medisinmenn, av disse en kvinnelig (moren til professor Drissa Diallo), ble intervjuet. Fire av medisinmennene brukte ikke *E. senegalensis* i sin praksis. Antallet medisinmenn som ble intervjuet var lavere i dette feltarbeidet enn i forrige, og vi så dermed også at et mindre antall indikasjoner ble nevnt. Men også her ble det relativt sett nevnt mange indikasjoner, og som i forrige feltarbeid ble mange av disse nevnt av bare en medisinmann, se Tabell 42 s.115. De vanligste indikasjonene, som ble nevnt av flest medisinmenn i dette området var malaria, ikterus og urinveisinfeksjon, se Figur 19 s.116. Også her var det vanlig å bruke dekokt av ulike deler av planten som styrkedrikk.

Lokale navn på *E. senegalensis*:

N'Té

N'Gumè

Donitulu

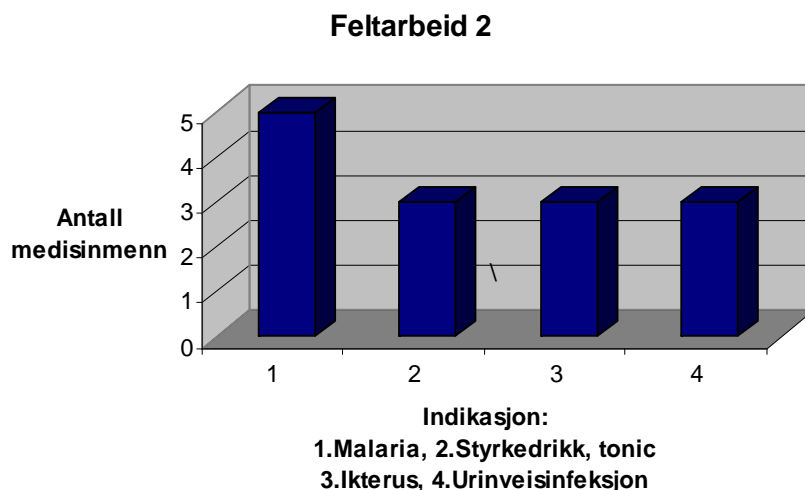
Sindian

Zoroblen



Indikasjon	Antall healere	Del av planten som benyttes	Antall healere	Formulering
Malaria	5	Stammebark Blader Rot	4 1 1	Dekokt/macerat, drikkes Dekokt, drikkes Dekokt, drikkes
Styrkedrikk	3	Stammebark, blader og rot Rot Stammebark og rot	1 1 1	Dekokt, drikkes Dekokt, drikkes Dekokt, vaske kroppen
Ikterus	3	Stammebark Rot	2 1	Pulver/dekokt, drikkes Macerat, drikkes
Urinveisinfeksjon	3	Stammebark Rot Blader	2 2 1	Pulver/dekokt, drikkes Macerat/dekokt, drikkes Dekokt, drikkes
Hodepine	2	Stammebark Blader	1 1	Røkelse, inhaleres Blandes med vann, inhaleres
Ryggsmerter	2	Blader Blader og stammebark	1 1	Dekokt, dampbad og massasje Dekokt, dampbad og massasje
Tyfoidefeber	1	Stammebark	1	Dekokt/macerat, drikkes
Lever sykdom	1	Stammebark	1	Macerat, drikkes
Søvnløshet	1	Stammebark	1	Pulver, drikkes
Onchocerciasis	1	Rot	1	Dekokt, drikkes
Neseblødning	1	Blader	1	Dampbad, inhaleres
Indre sår	1	Blader Stammebark	1 1	Dekokt, drikkes Dekokt, drikkes
Dysmenorrhea	1	Blader Stammebark	1 1	Dekokt, drikkes Dekokt, drikkes
Magesmerter	1	Stammebark	1	Pulver → macerat, drikkes
Brystsmerter	1	Blader	1	Dekokt, drikkes, dampbad og vaske kroppen
Diaré	1	Stammebark Rot	1 1	Dekokt, drikkes Dekokt, drikkes
Hemoroider	1	Stammebark og rot	1	Dekokt, vaske lokalt

**Tabell 42:** Feltarbeid 2, resultater



**Figur 19:** Feltarbeid 2, vanligste indikasjoner

Malaria og amenorrhea var de indikasjonene som gikk igjen flest ganger i de to undersøkelsene. I tillegg er planten mye brukt i styrkedrikker. De to feltarbeidene ga ikke nok informasjon til å trekke noen konklusjoner, men det kan spekuleres i om planten kan inneholde noen komponenter med effekt ved amenorrhea. Malaria er en sykdom som er et stort problem i Mali og det kan derfor tenkes at bruken ved denne indikasjonen skyldes at man benytter seg av "alle" planter i forsøket på å kurere sykdommen, og ikke nødvendigvis det at den gir god effekt. Resultatene fra disse undersøkelsene stemmer overens med tidligere arbeid som er utført (Theis 2006).

## 7 Konklusjon

Fra diklormetanrækstraktet av rotbarken til planten *Erythrina senegalensis* ble det isolert fire renstoffer, erybraedin A, erybraedin C, erybraedin D og eryvarin K, i tillegg ble et renstoff som ikke tidligere er beskrevet i litteraturen isolert og strukturoppklart. Dette stoffet har det systematiske navnet 9-hydroksy-8-metoksy-6',6'-dimetylpyrano[2',3':3,4]pterocarpan.

Av renstoffene som ble isolert er kun ett, erybraedin A, tidligere isolert fra *E. senegalensis*. For erybraedin C, erybraedin D og eryvarin K er dette den første beskrivelsen av isolering fra denne planten.

De kjente stoffene viste seg å være kraftige hemmere av 15-lipoksygenase, med  $IC_{50}$  verdier fra  $<12,5$   $\mu\text{g/ml}$  til  $25$   $\mu\text{g/ml}$ . De viste også en hemmende aktivitet overfor bakterien *Staphylococcus aureus* i antibakterielle tester. Erybraedin C var tilnærmet inaktiv som adenosin deaminasehemmer. Toksisitetstesting av erybraedin C viste at denne ga høyere dødelighet enn blankprøve, men tallmaterialet som fremkom av testen var sprikende.

Informasjonsmaterialet om bruken av *E. senegalensis* som ble samlet inn under feltarbeidene i Mali var ikke stort nok til at det kunne trekkes noen konklusjoner. Men det fremkom at dette er en plante som anvendes ved veldig mange ulike indikasjoner, noen av disse, som malaria og amenorrhea, er vanligere enn de andre. Dette er også sett i tidligere arbeid som er gjort på planten. Det viste seg også at det var relativt vanlig å bruke tilberedninger av planten som styrkedrikk.

## 7.1 Forslag til videre arbeid

Både renstoffene isolert fra diklormetanrækstraktet av rotbarken til *E. senegalensis* og diklormetanrækstraktet selv var kraftige hemmere av 15-lipoksygenase. Det kunne derfor vært interessant å se nærmere på aktiviteten til fraksjoner som ikke ble testet i denne hovedfagsoppgaven. I den forbindelse ville det også være aktuelt med ytterligere fraksjonering av disse fraksjonene og deretter strukturoppklaring av komponentene som blir isolert. I tillegg kunne det være aktuelt å forsøke å isolere substansene som degraderte underveis i arbeidet med mer skånsomme metoder.

Det ble ikke utført noen bioaktivitetstester på den nye substansen som ble isolert i oppgaven, dette vil være aktuelt å gjennomføre.

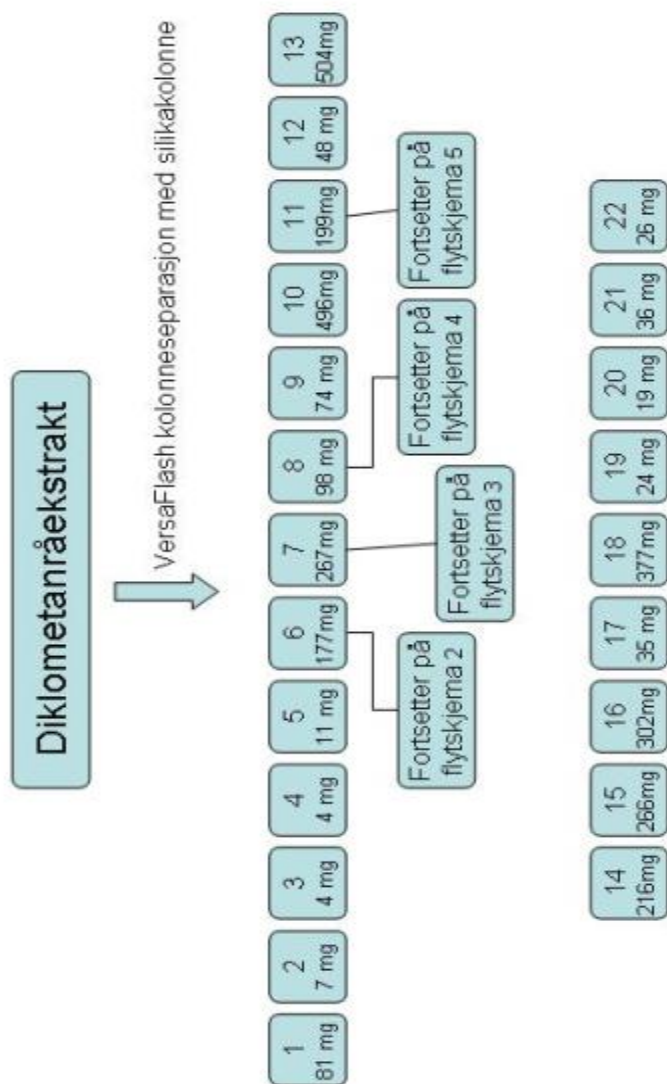
Det kunne også være interessant å teste de allerede isolerte stoffene, evt. i tillegg til andre fraksjoner, mot andre bakterier enn *Staphylococcus aureus* og mot patogene sopparter.

I denne oppgaven ble det fokusert på diklormetanrækstraktet, og metanolrækstraktet ble ikke arbeidet videre med etter den første fraksjoneringen. Det kunne være aktuelt å se på struktur og bioaktivitet til komponenter i dette ekstraktet.

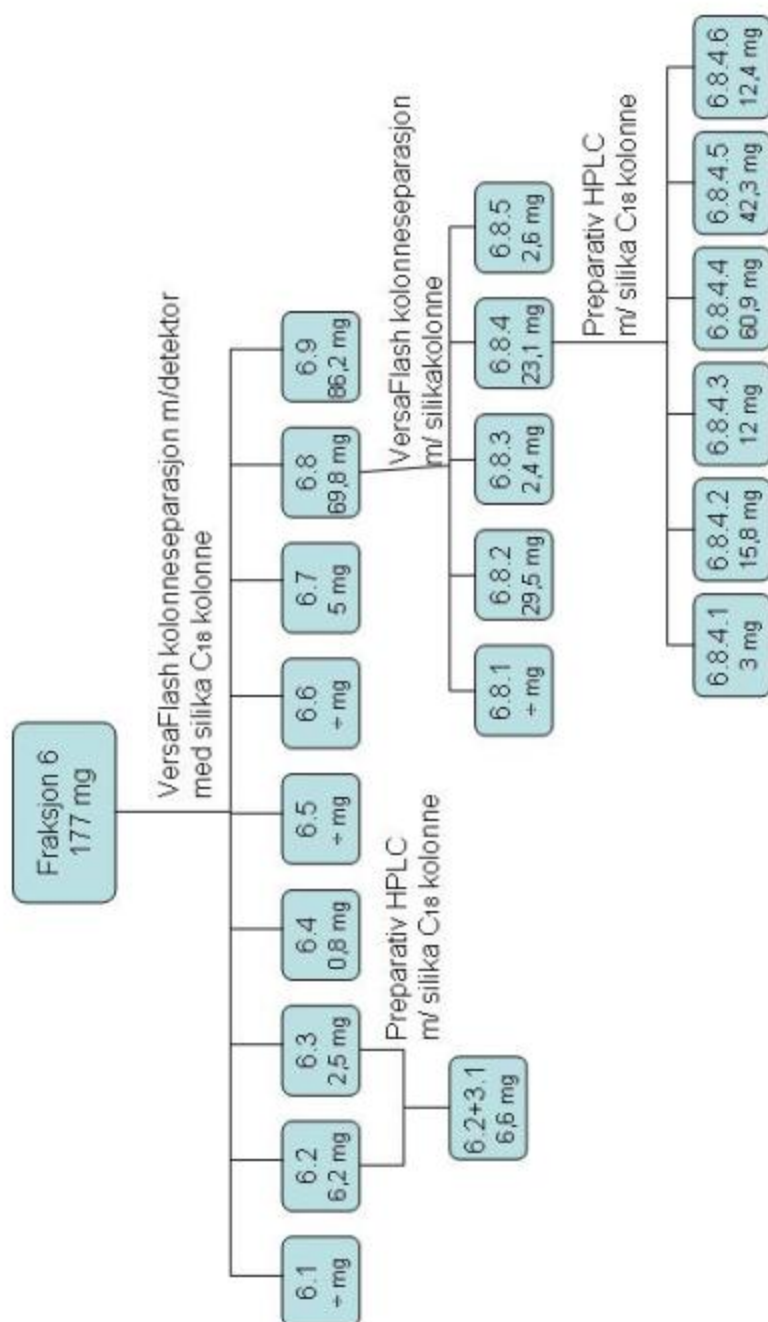
## 8 Vedlegg

### 8.1 Flytskjema

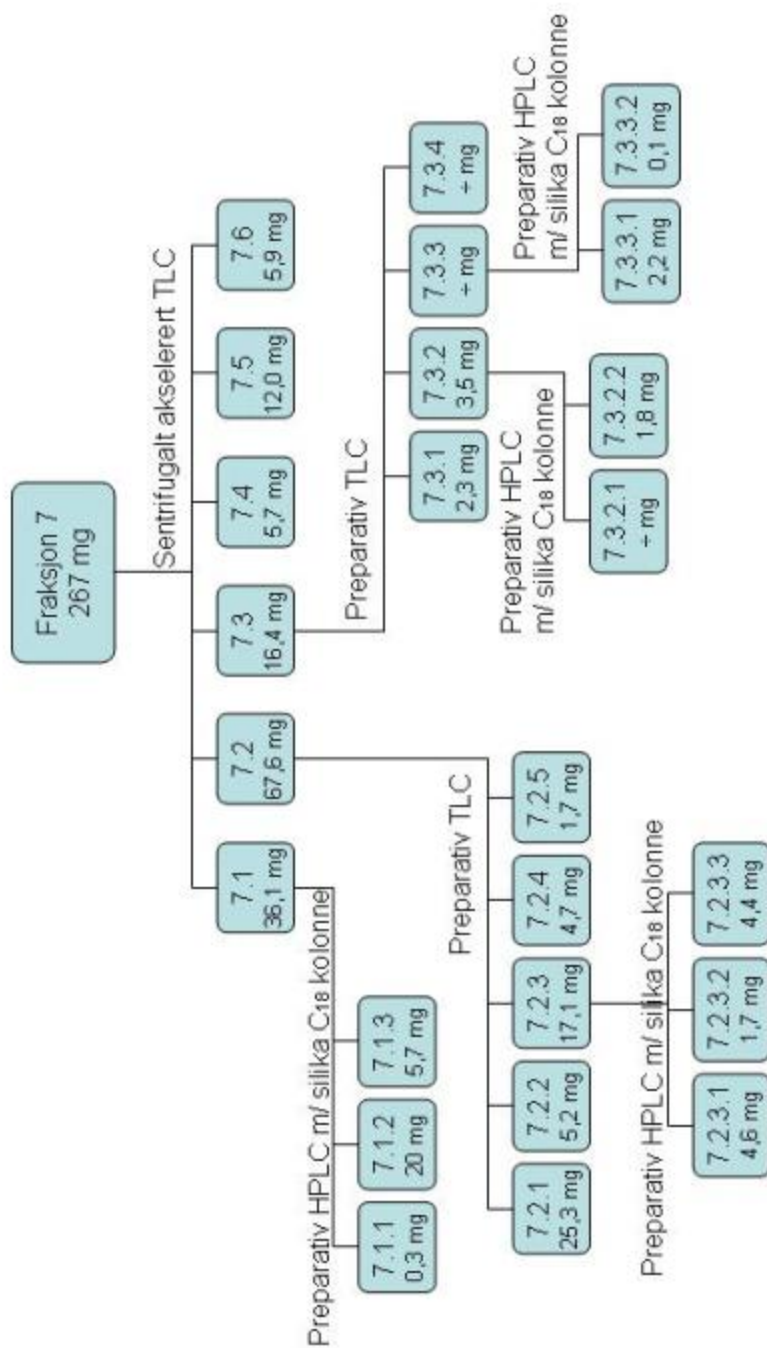
#### 8.1.1 Flytskjema 1



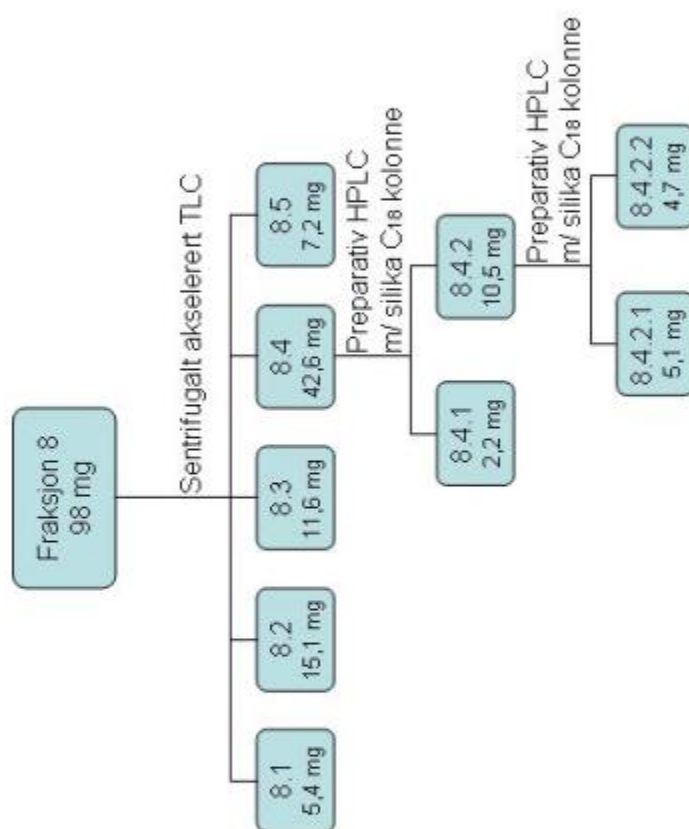
## 8.1.2 Flytskjema 2



## 8.1.3 Flytskjema 3

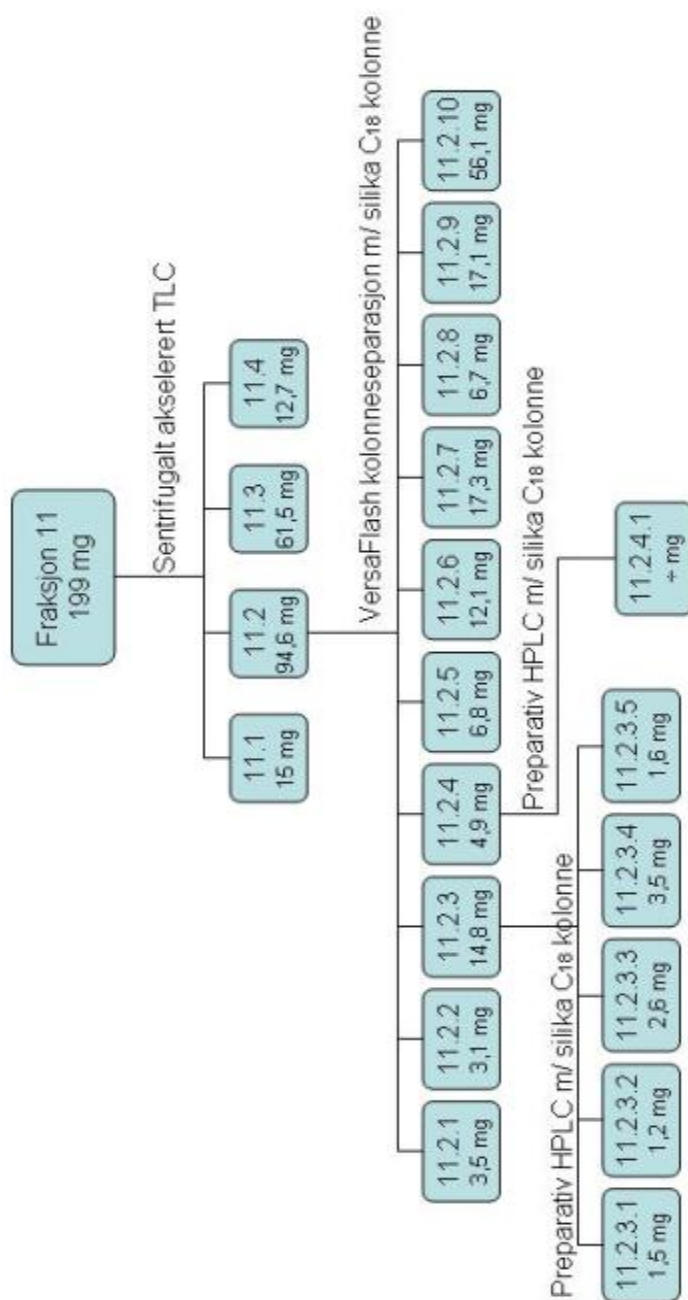


## 8.1.4 Flytskjema 4

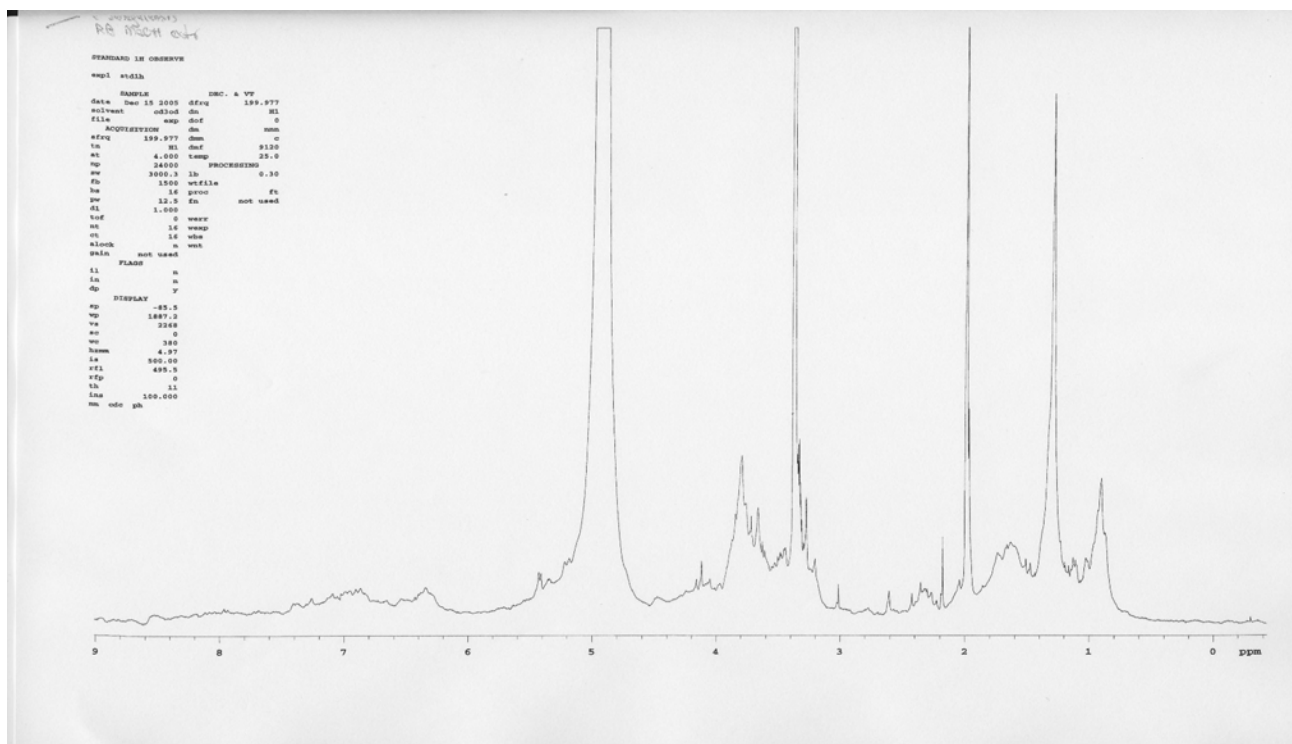




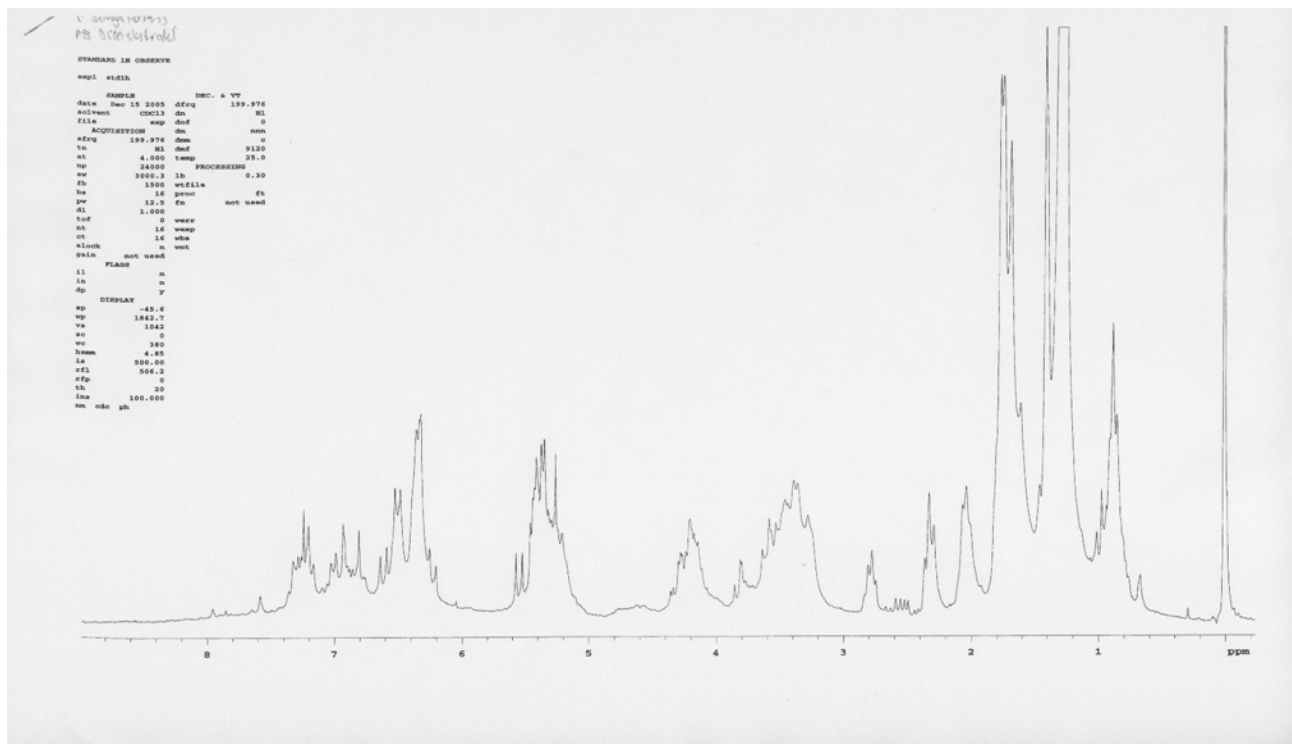
## 8.1.5 Flytskjema 5



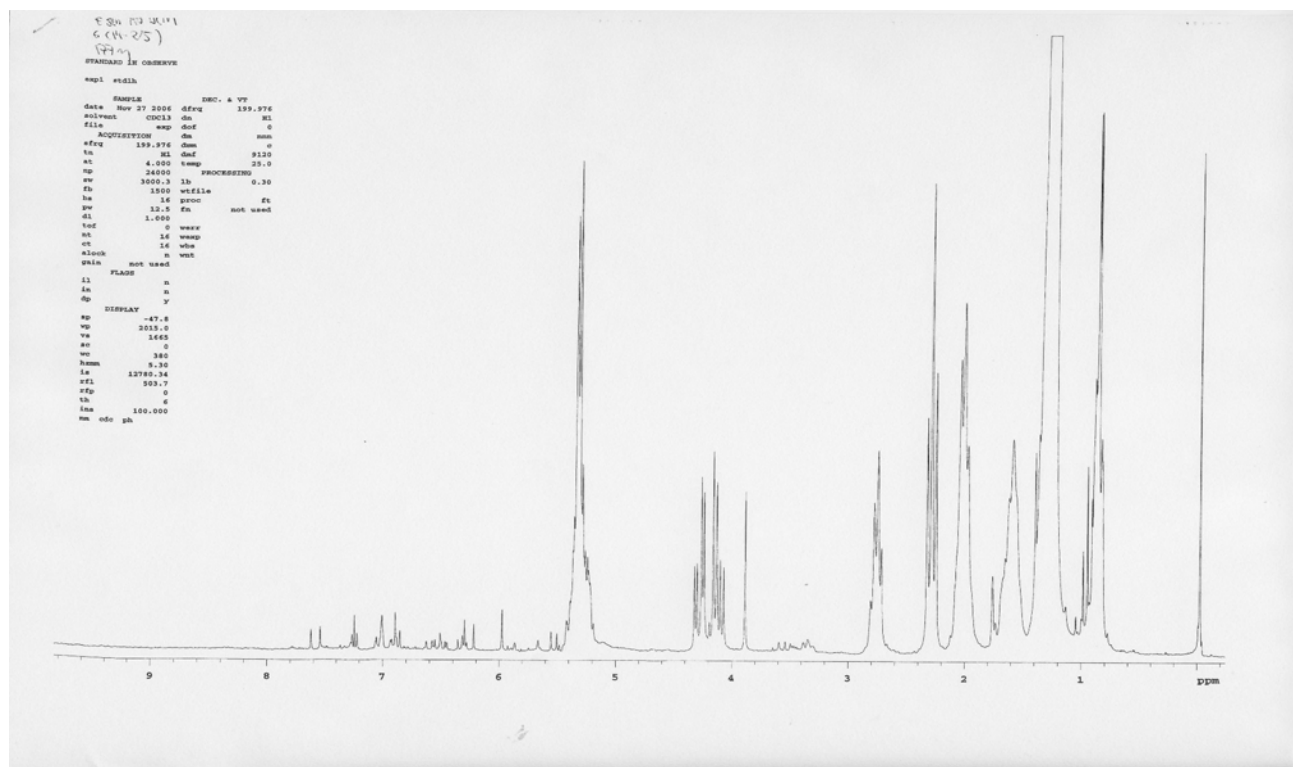
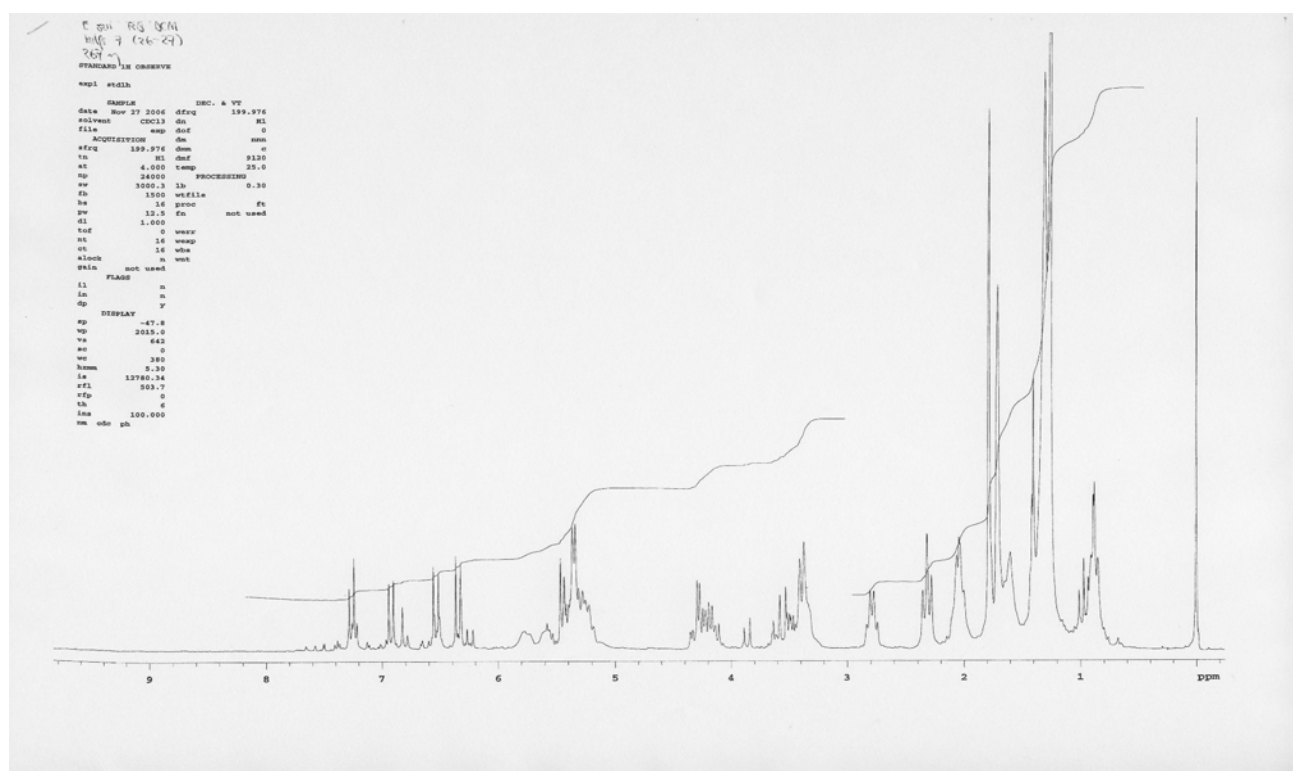
## 8.2 NMR- og MS-spektra

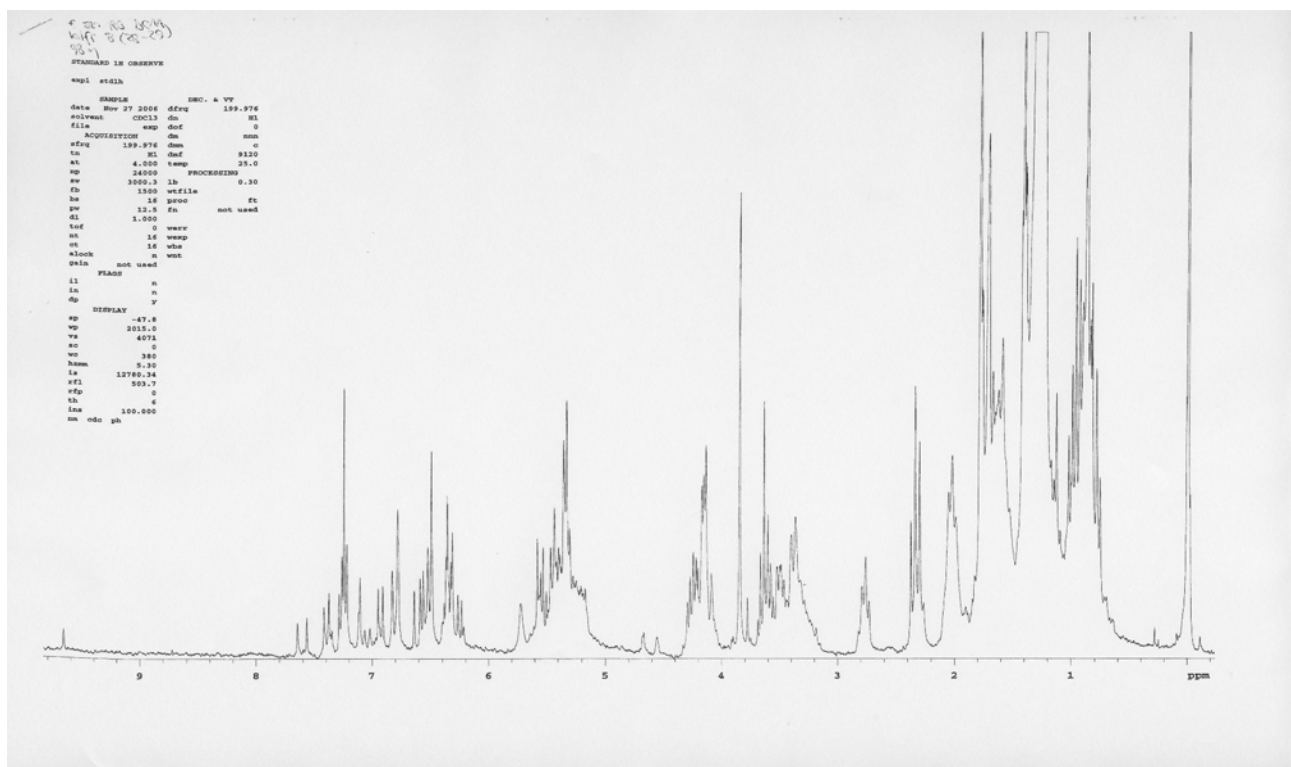
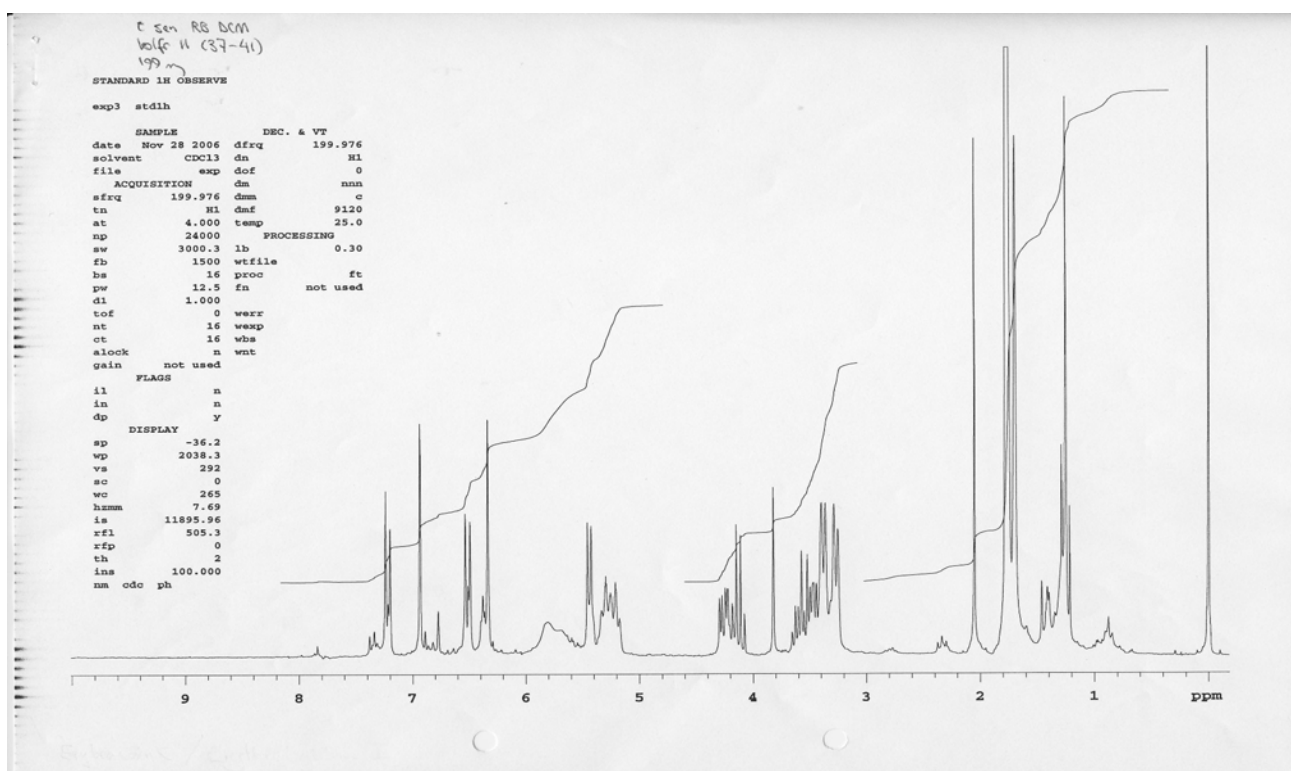


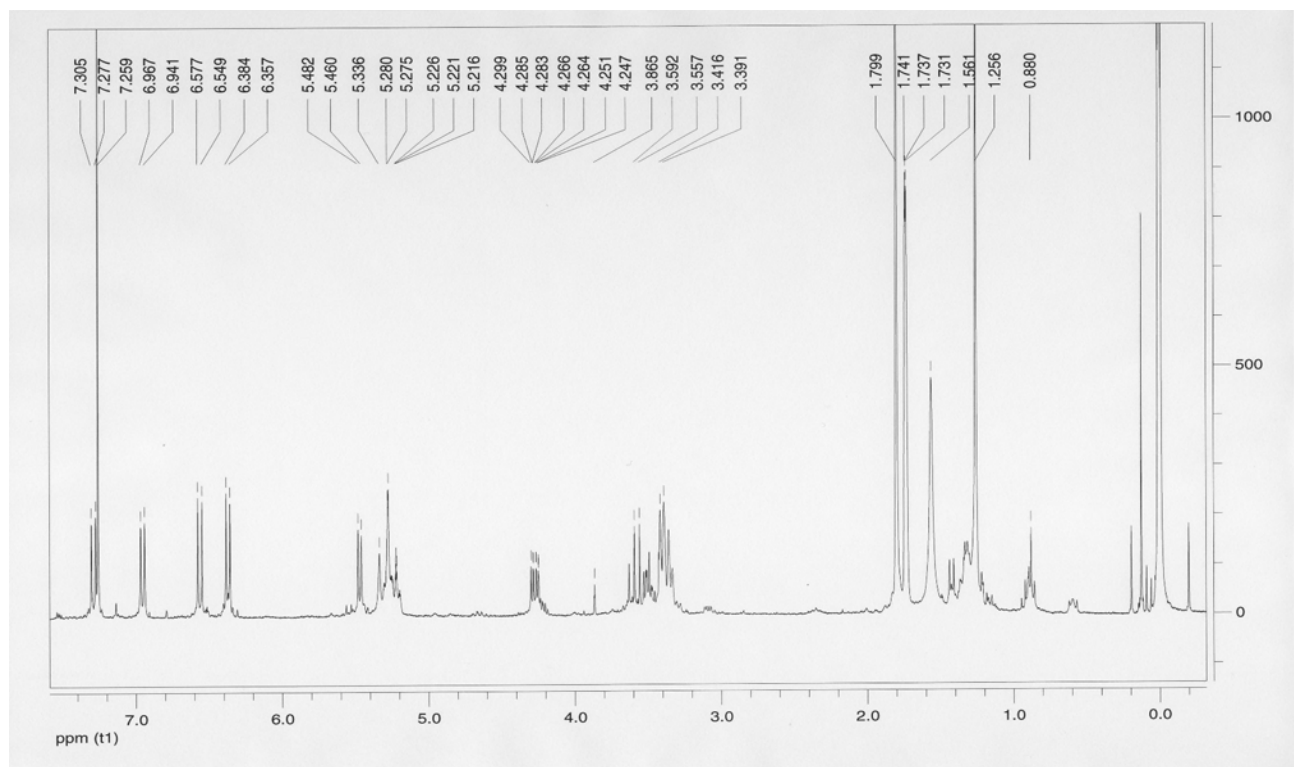
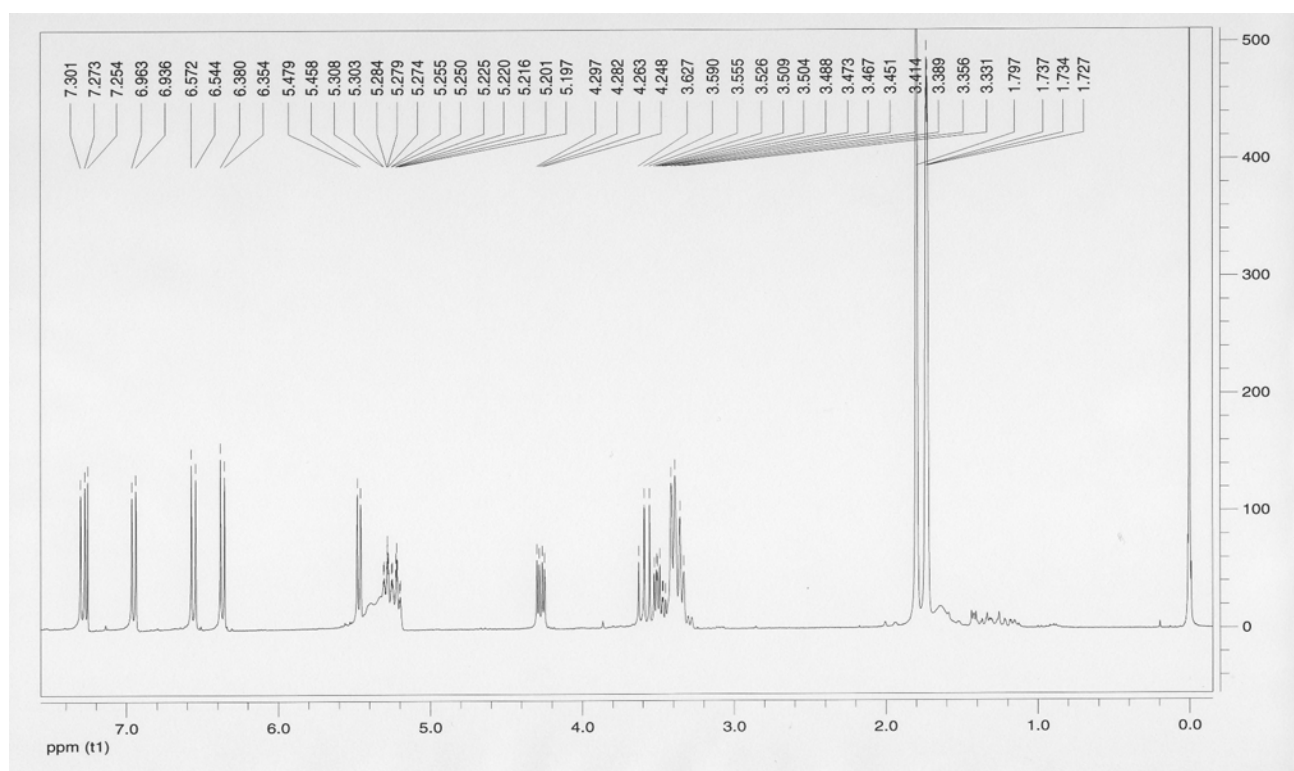
Vedlegg 1:  $^1\text{H}$  NMR spektrum metanolrækstrakt

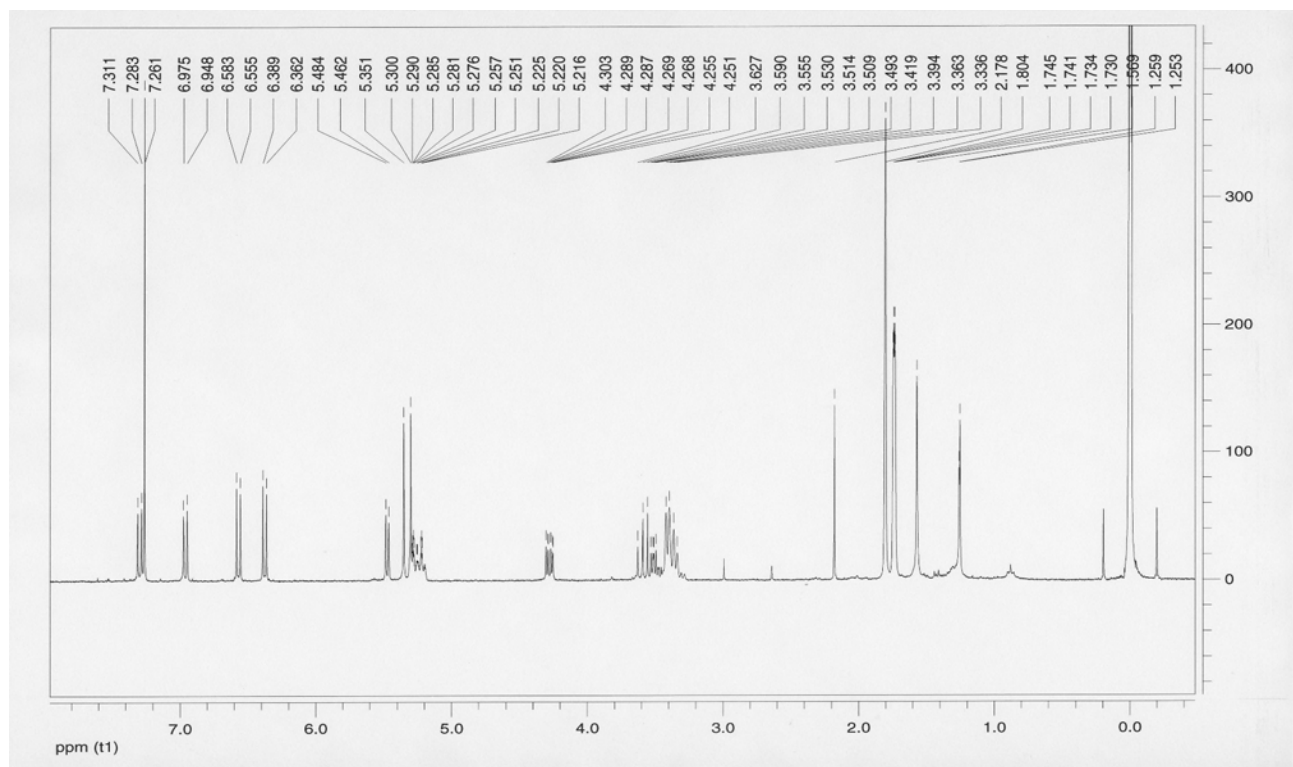
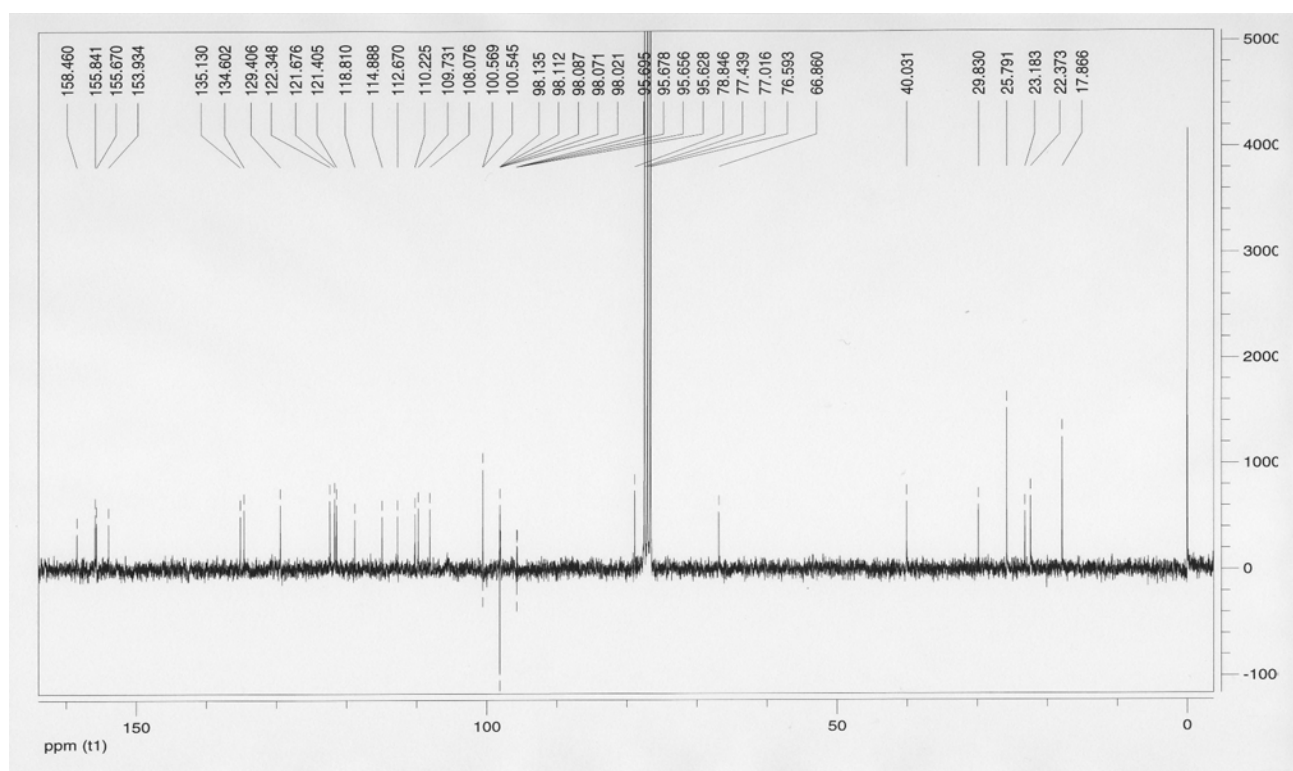


Vedlegg 2:  $^1\text{H}$  NMR spektrum diklormetanrækstrakt

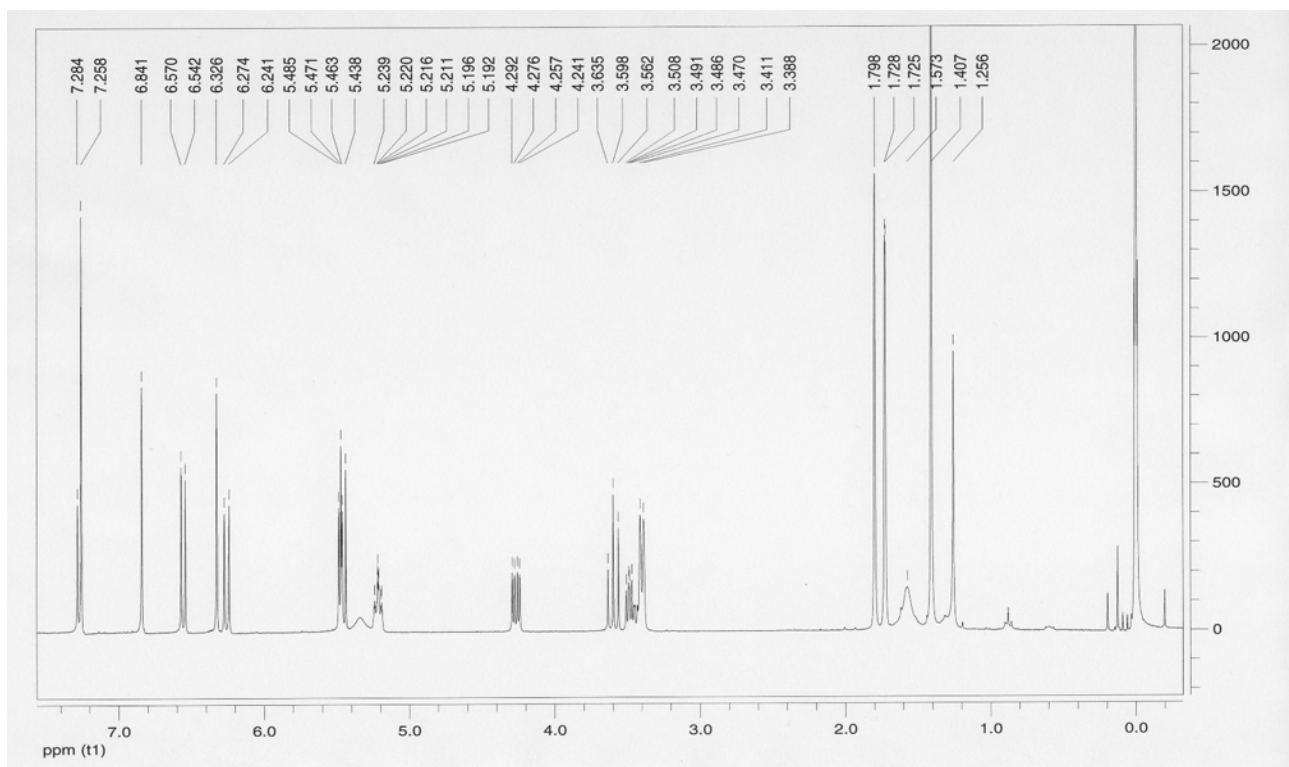
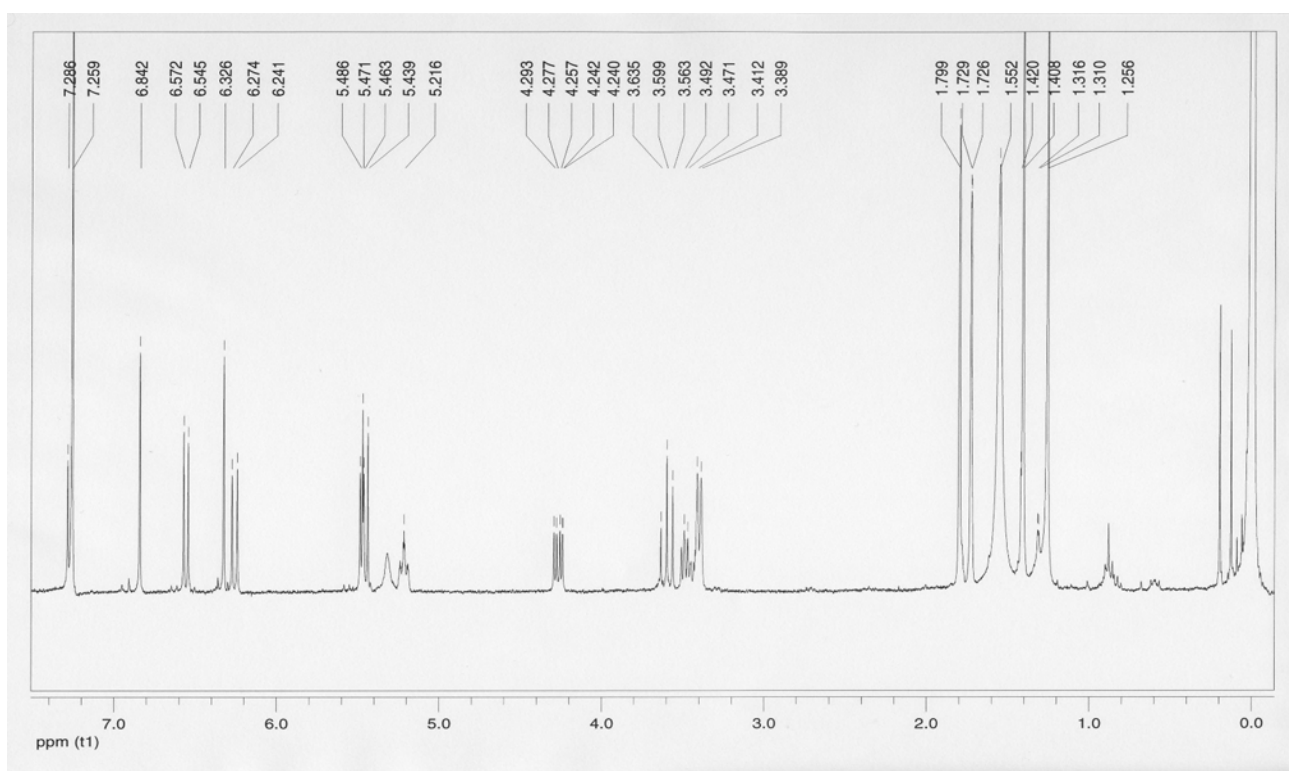
Vedlegg 3:  $^1\text{H}$  NMR spektrum fraksjon 6Vedlegg 4:  $^1\text{H}$  NMR spektrum fraksjon 7

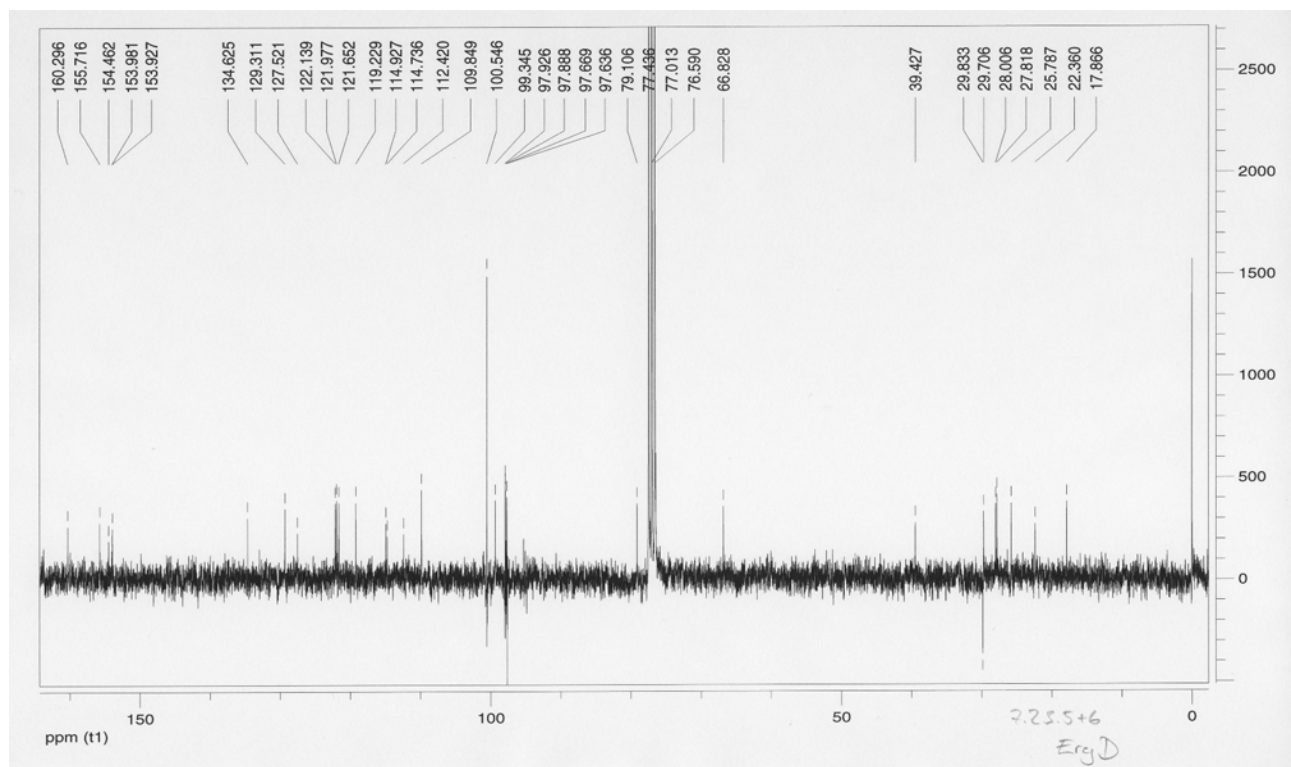
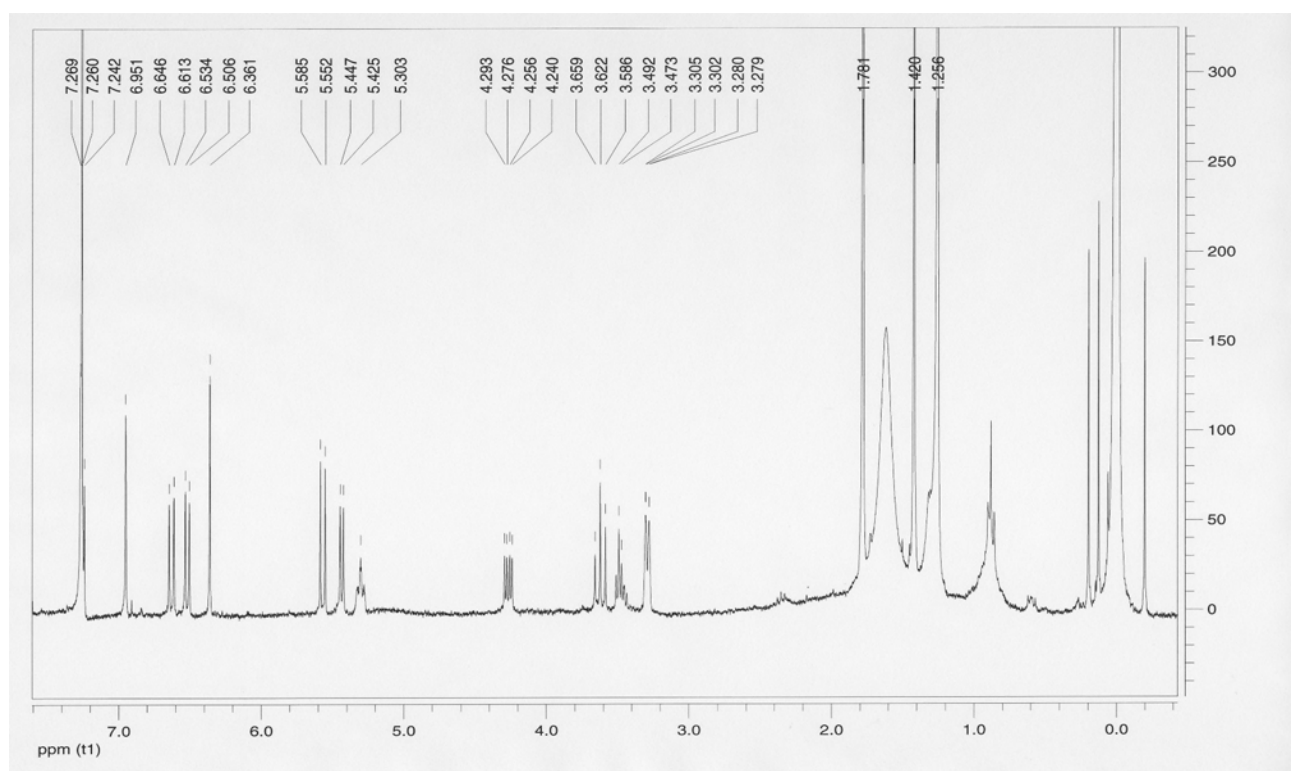
Vedlegg 5:  $^1\text{H}$  NMR spektrum fraksjon 8Vedlegg 6:  $^1\text{H}$  NMR spektrum fraksjon 11

**Vedlegg 7:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum av 7.1.1**Vedlegg 8:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum av 7.1.2

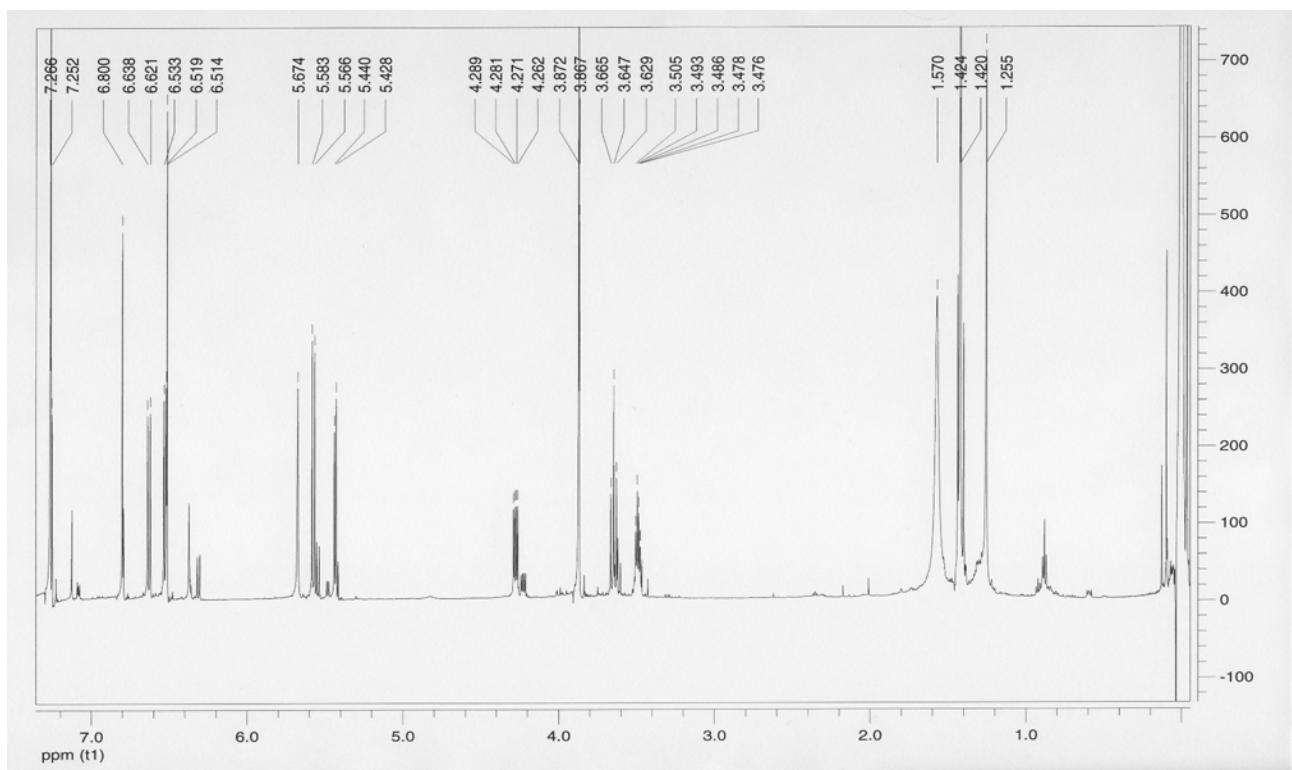
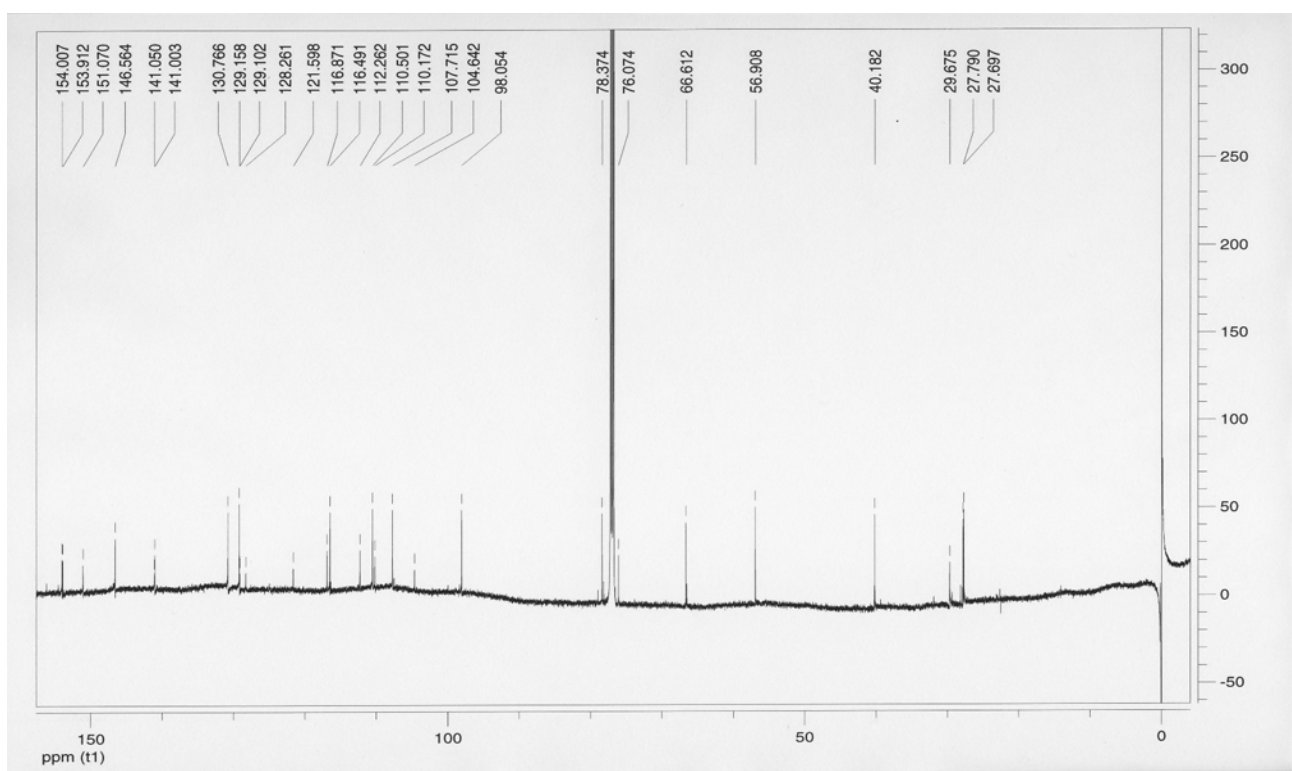
Vedlegg 9:  $^1\text{H}$  NMR spektrum 8.1Vedlegg 10:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum 7.1.2

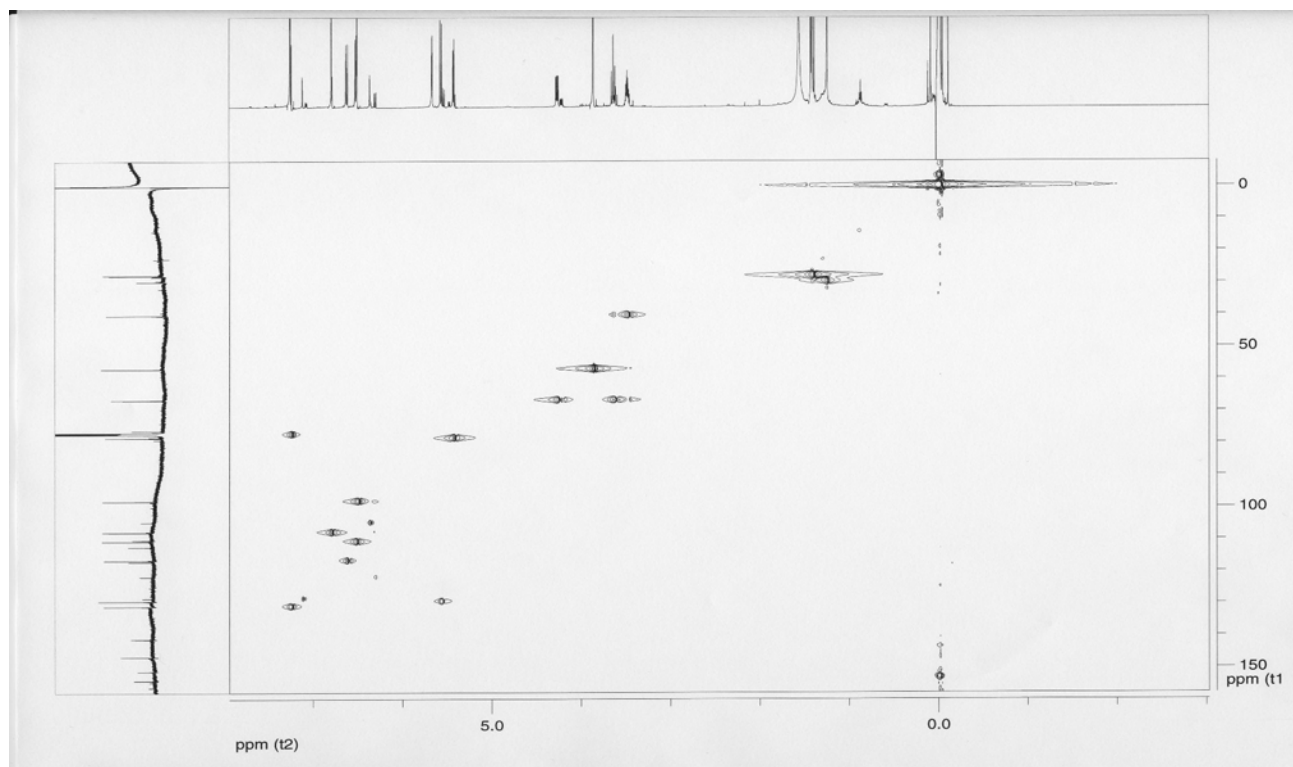
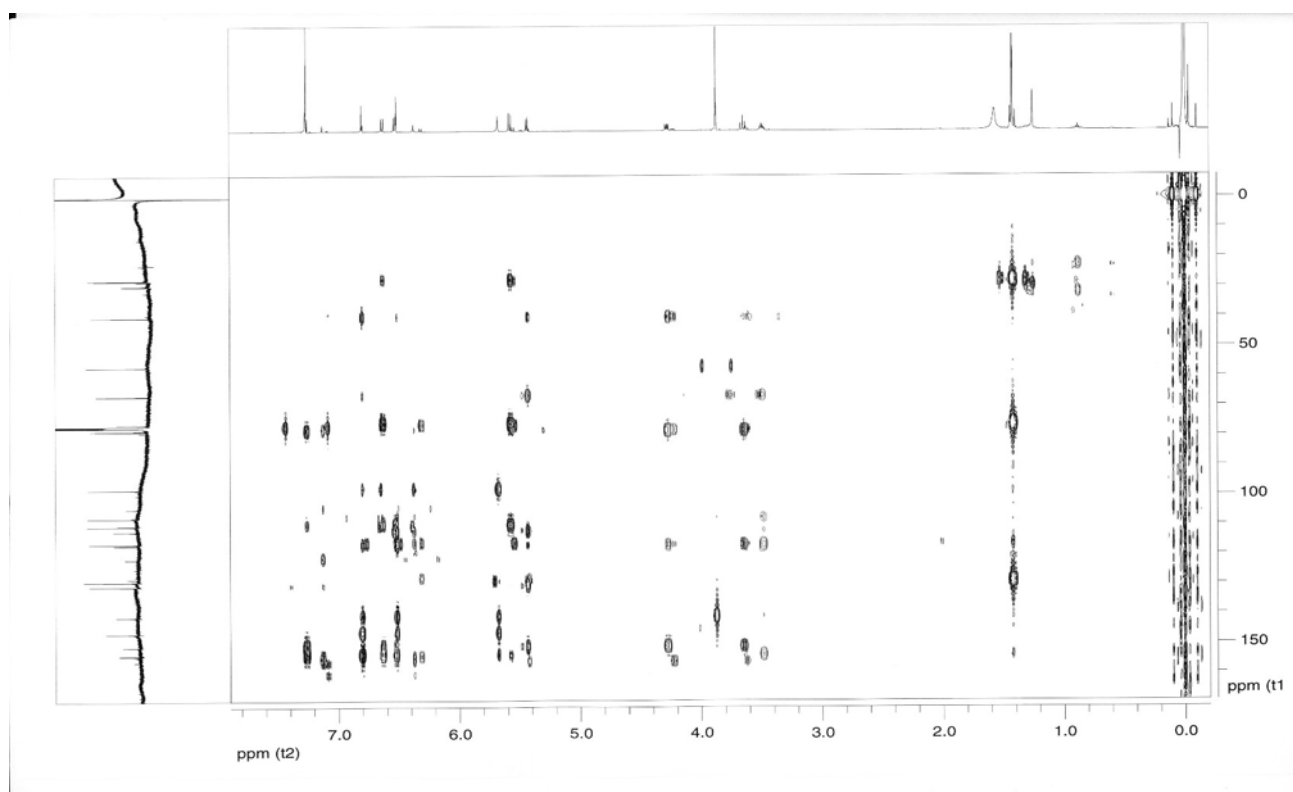


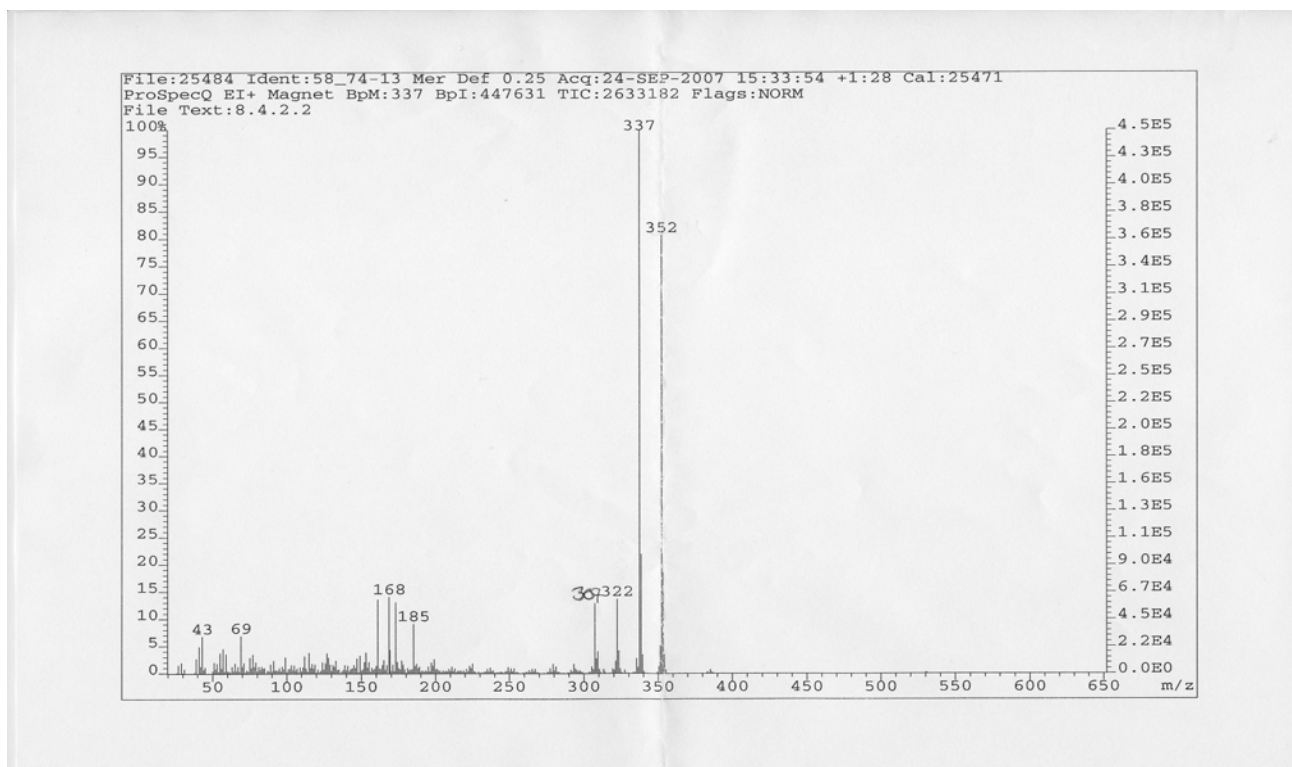
**Vedlegg 11:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum 7.2.3.1**Vedlegg 12:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum 7.2.3.2

**Vedlegg 13:**  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum 7.2.3.(1-2)**Vedlegg 14:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum 7.2.3.3

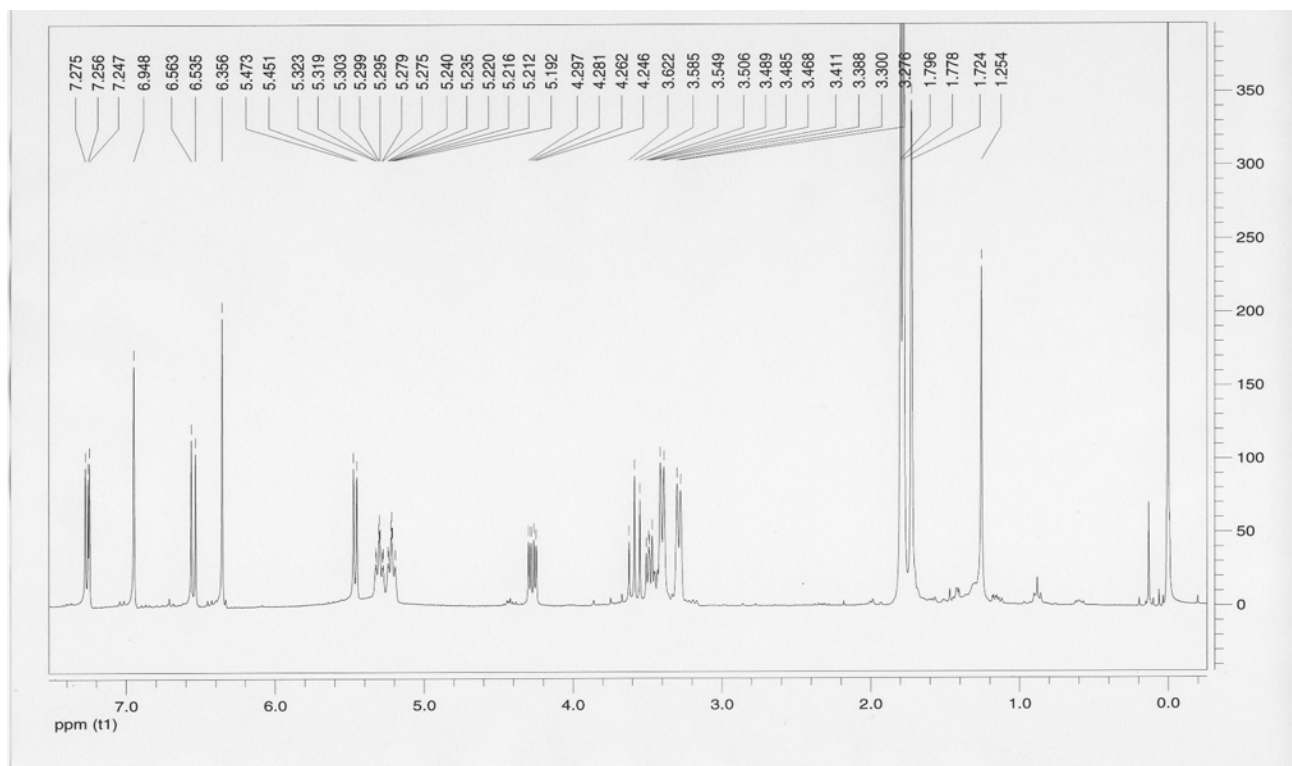


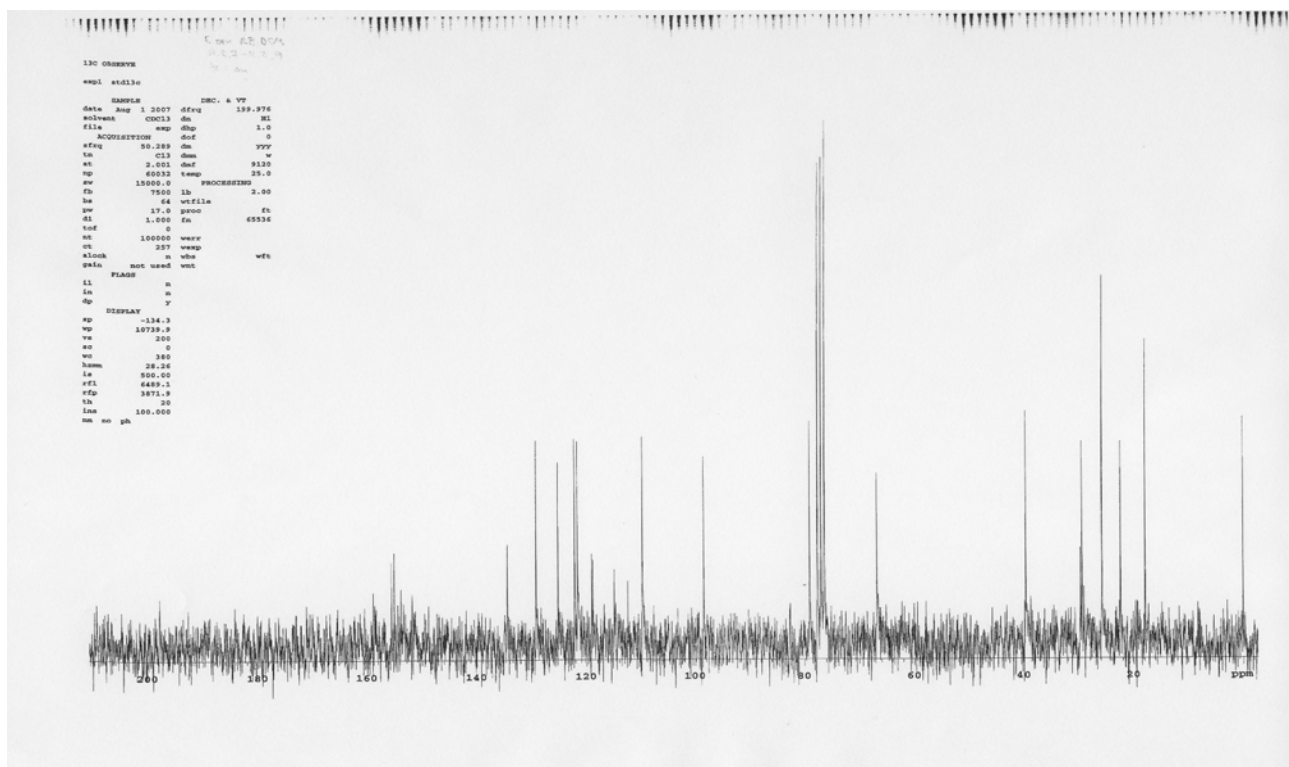
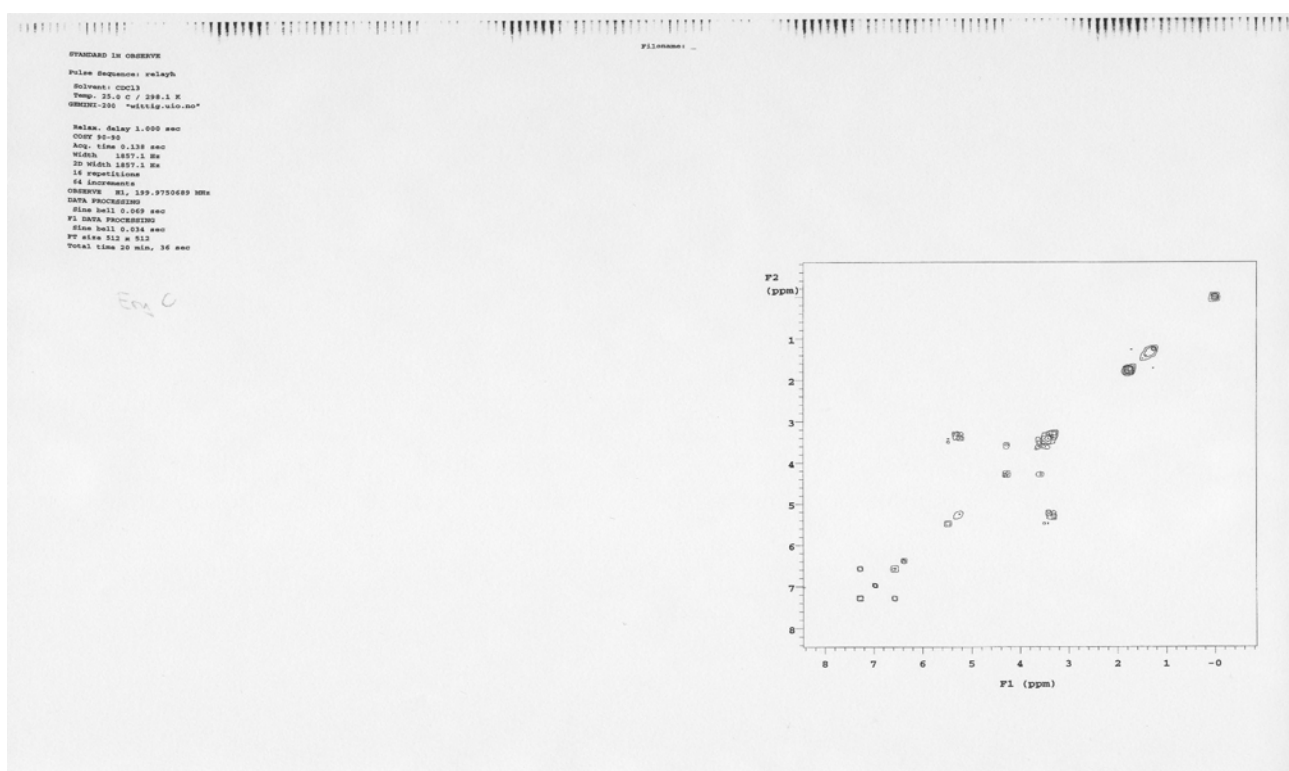
Vedlegg 15:  $^1\text{H}$  NMR spektrum 8.4.2.2Vedlegg 16:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum 8.4.2.2

**Vedlegg 17:** HSQC spektrum 8.4.2.2**Vedlegg 18:** HMBC spektrum 8.4.2.2

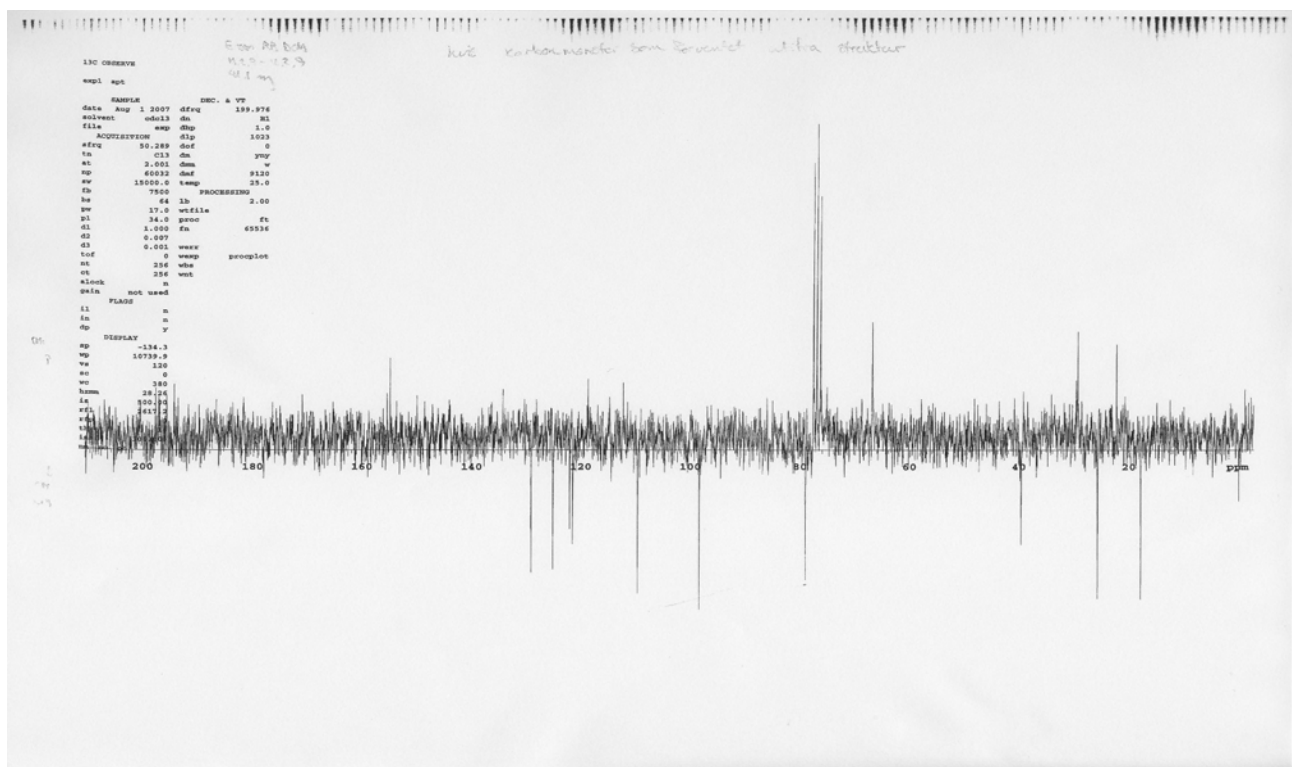


Vedlegg 19: MS spektrum 8.4.2.2

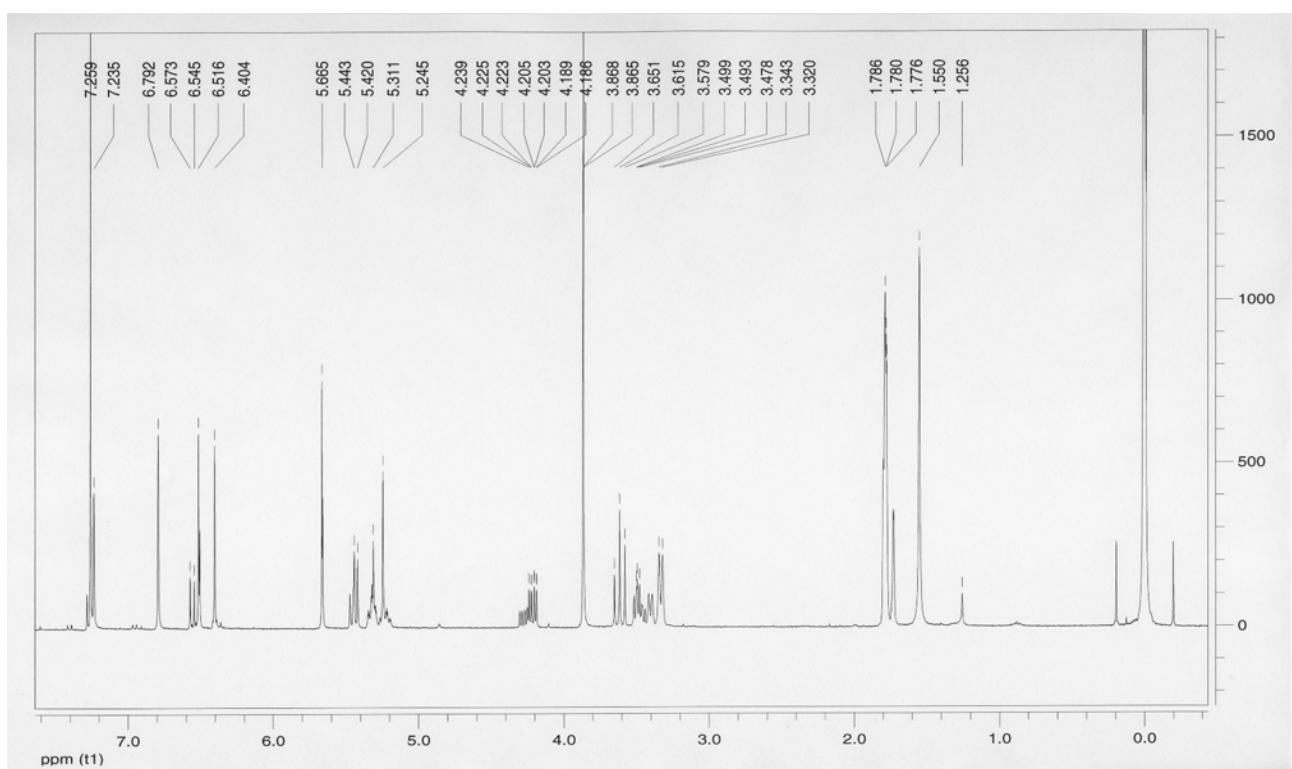
Vedlegg 20:  $^1\text{H}$  NMR spektrum 11.2.9

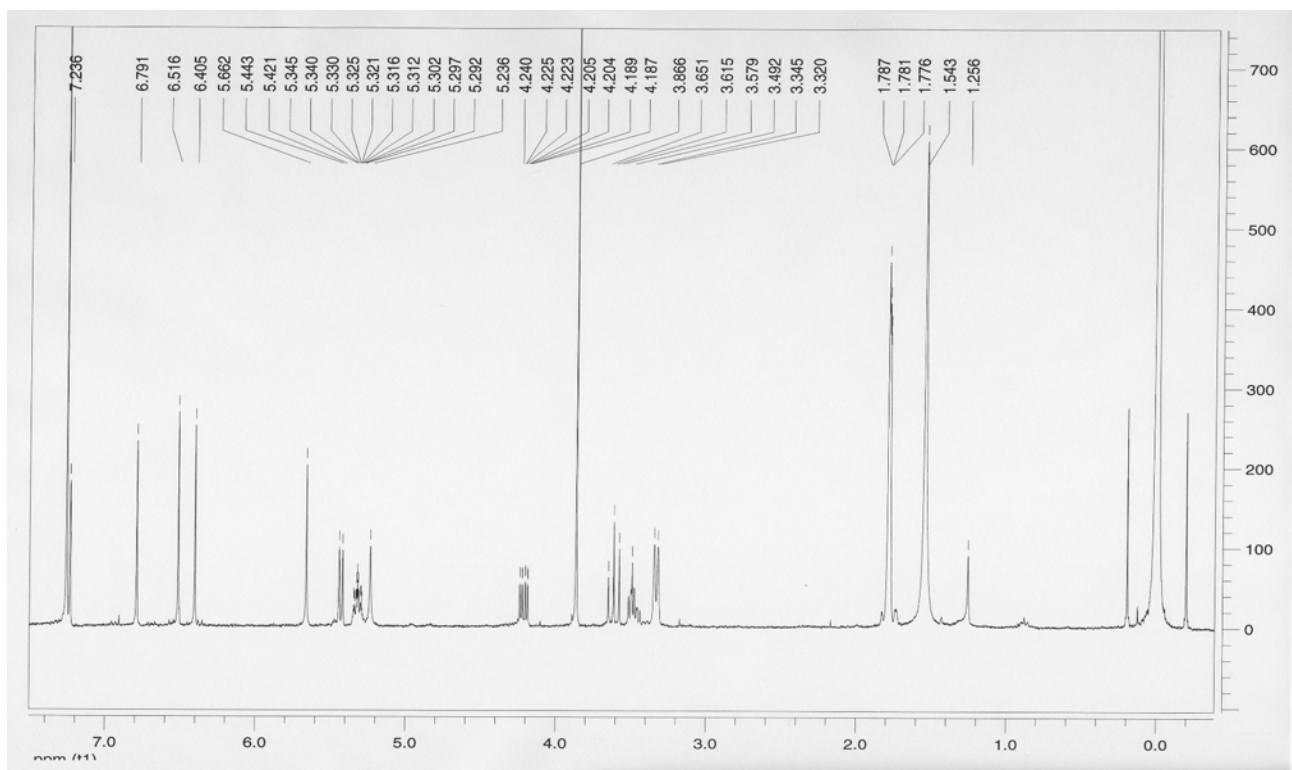
Vedlegg 21:  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum 11.2.(7-9)

Vedlegg 22: COSY spektrum 11.2.(7-9)

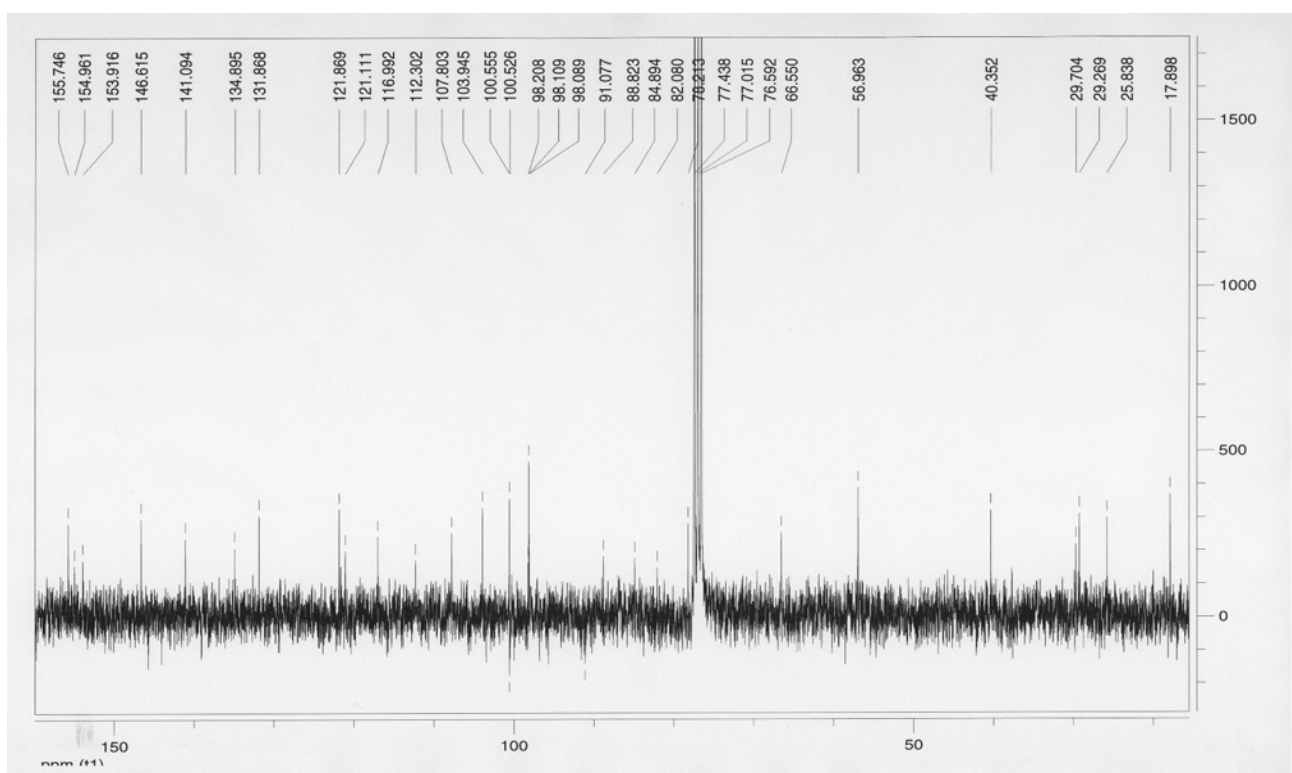


Vedlegg 23: APT spektrum 11.2.(7-9)

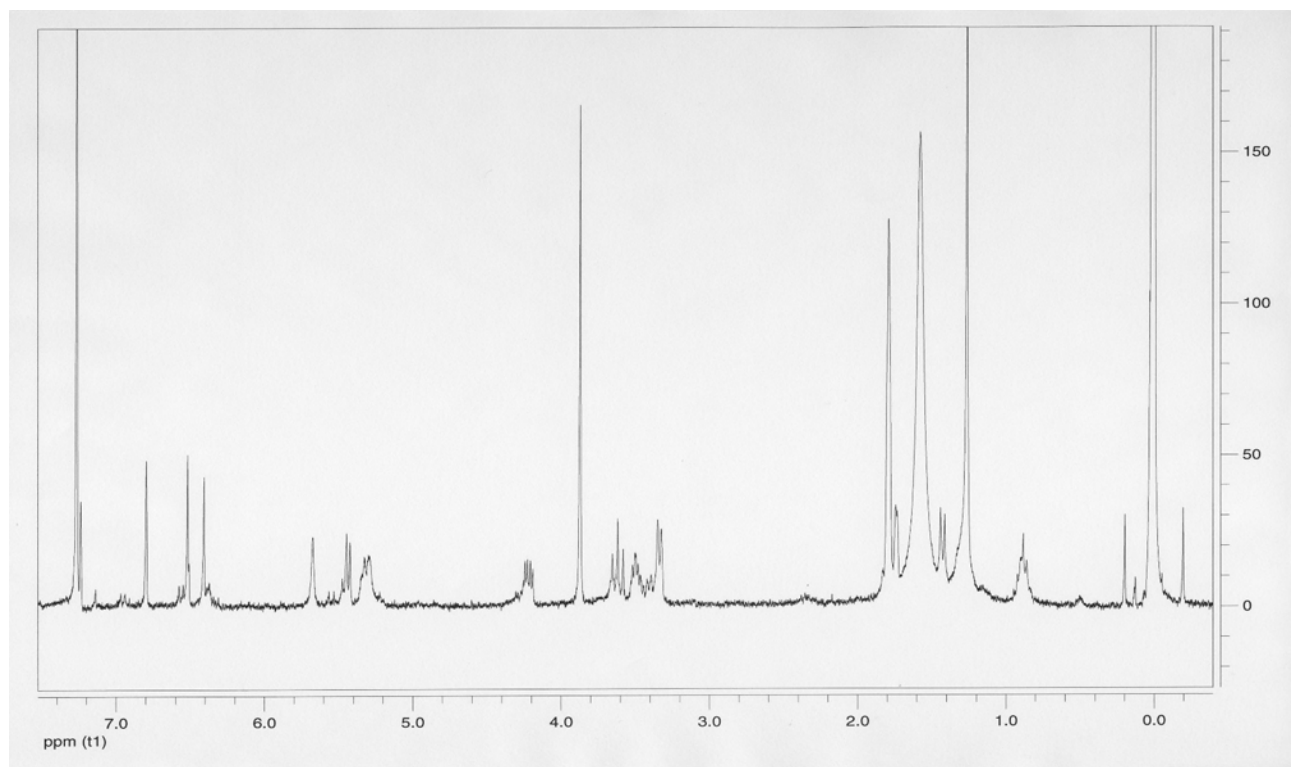
Vedlegg 24:  $^1\text{H}$  NMR spektrum 11.2.3.4



**Vedlegg 25:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum 11.2.3.5



**Vedlegg 26:**  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum 11.2.3,4-k



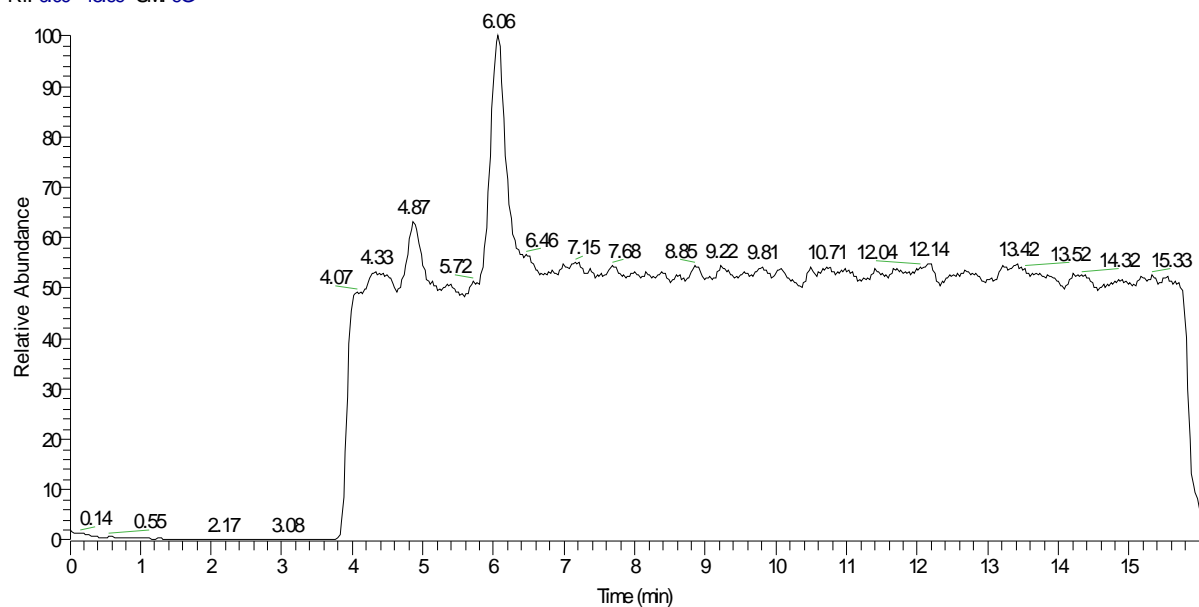
**Vedlegg 27:**  $^1\text{H}$  NMR spektrum 11.2.4.1

C:\calibur\...\2007101105

10/11/2007 1:44:45 PM

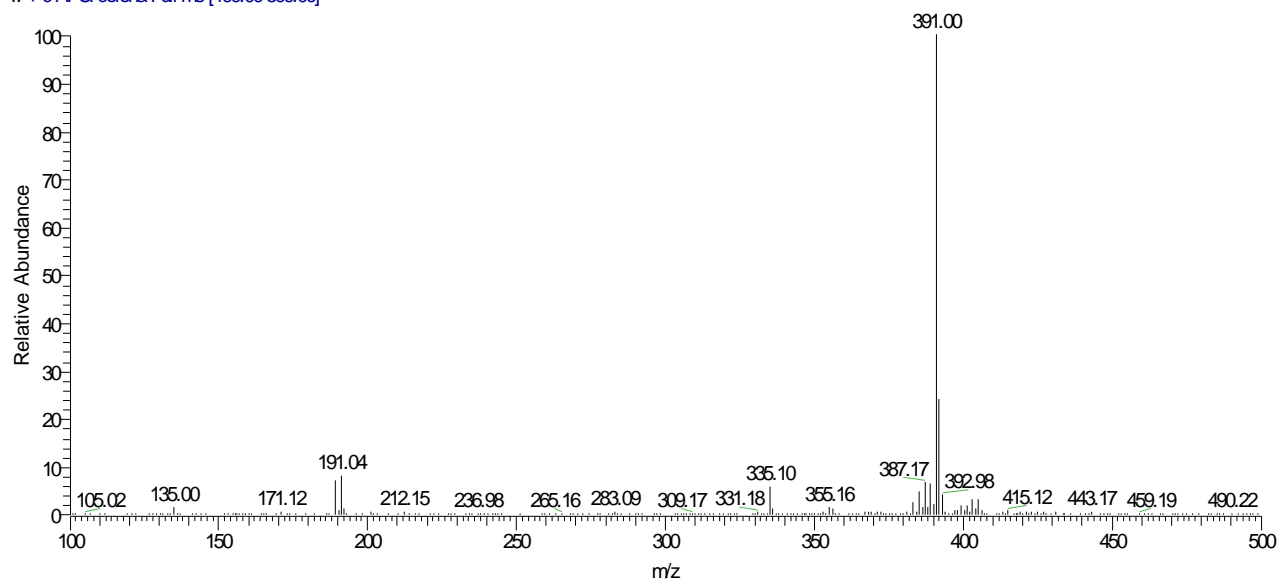
Erybraedin D

RT: 0.00 - 15.99 SM: 9G



NL:  
2.65E8  
TIC MS  
2007101105

2007101105 #217-233 RT: 5.88-6.30 AV: 17 SB: 99 5.24-5.74, 6.73-8.80 NL: 3.81E7  
T: + c APCI corona Full ms [100.00-500.00]



**Vedlegg 28:** LC/MS spektrum 7.2.3.(1-2), erybraedin D

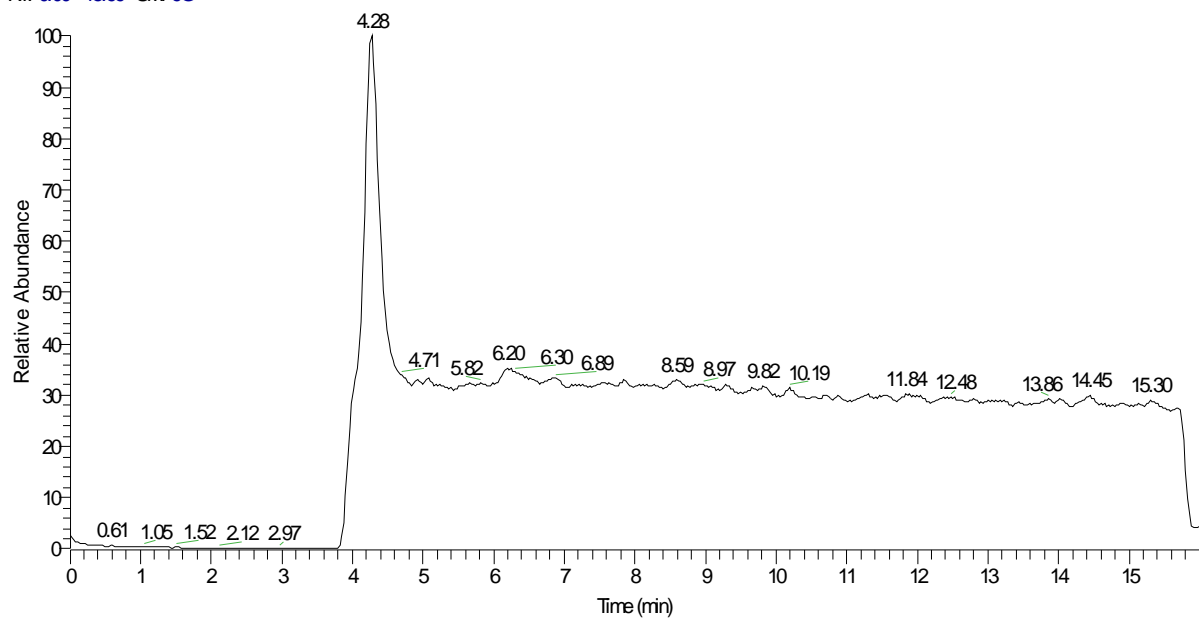


C:\calibur...\2007101106

10/11/2007 2:01:44 PM

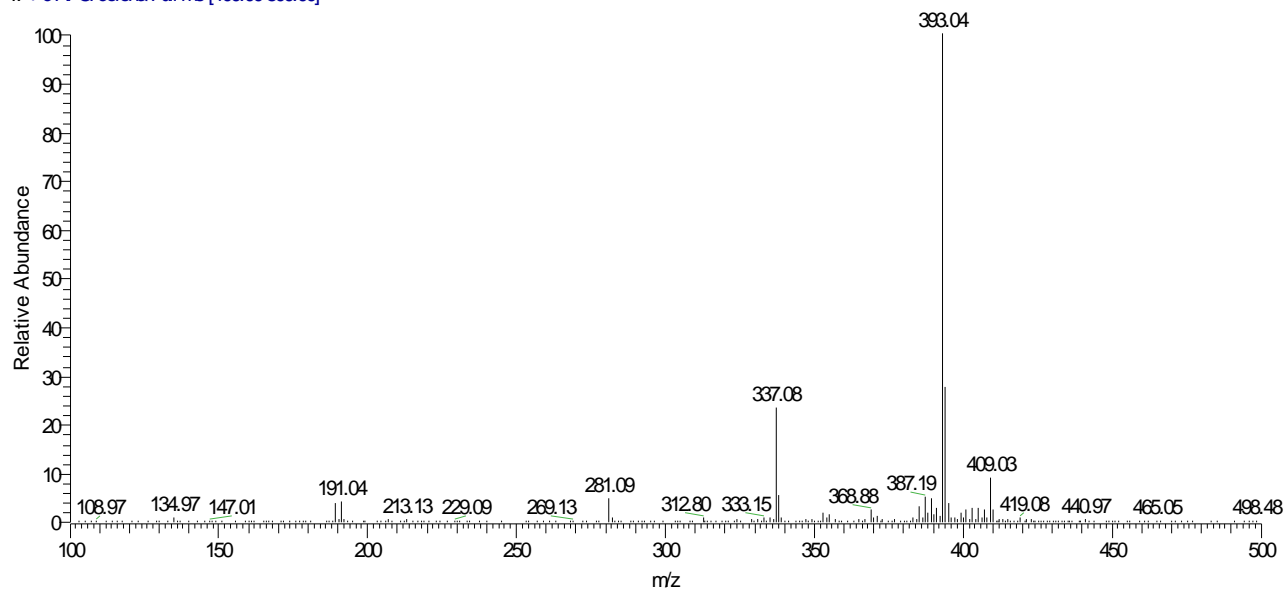
Erybraedin A

RT: 0.00 - 15.99 SM: 9G



NL:  
4.02E8  
TIC MS  
2007101106

2007101106#153-165 RT: 4.17-4.49 AV: 13 SB: 113 4.87-7.85 NL: 7.84E7  
T: + c APCI corona Full ms [100.00-500.00]



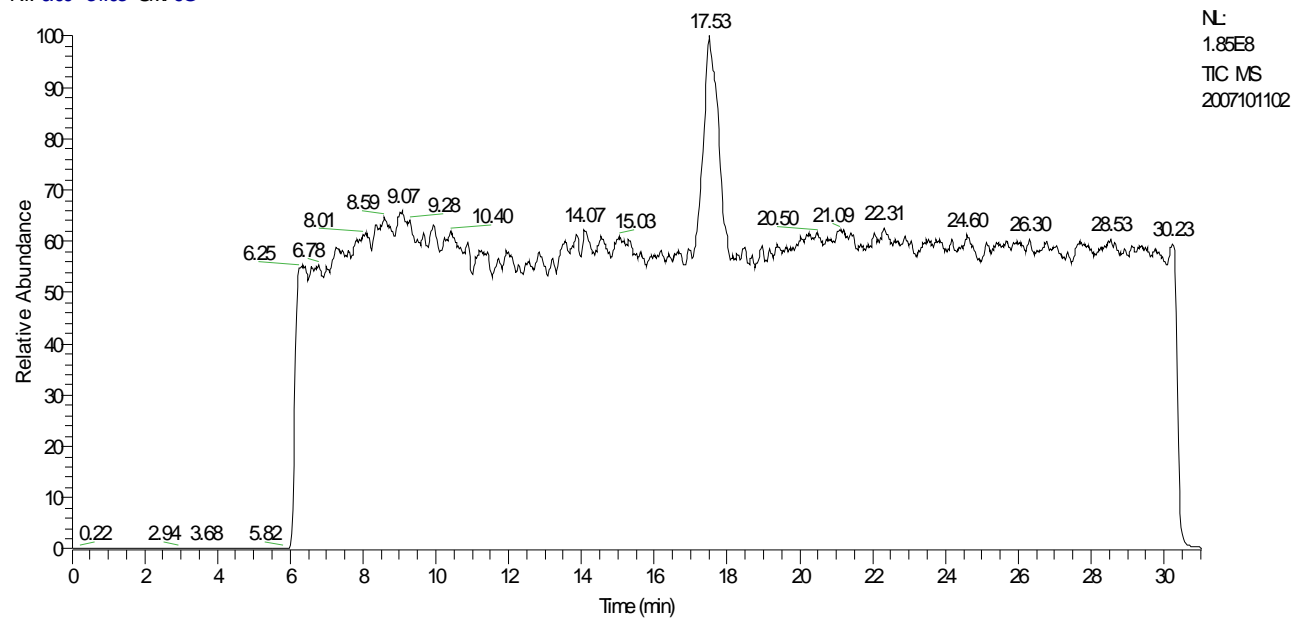
**Vedlegg 29:** LC/MS spektrum 7.1.1+7.1.2+8.1, erybraedin A

C:\calibur\...2007101102

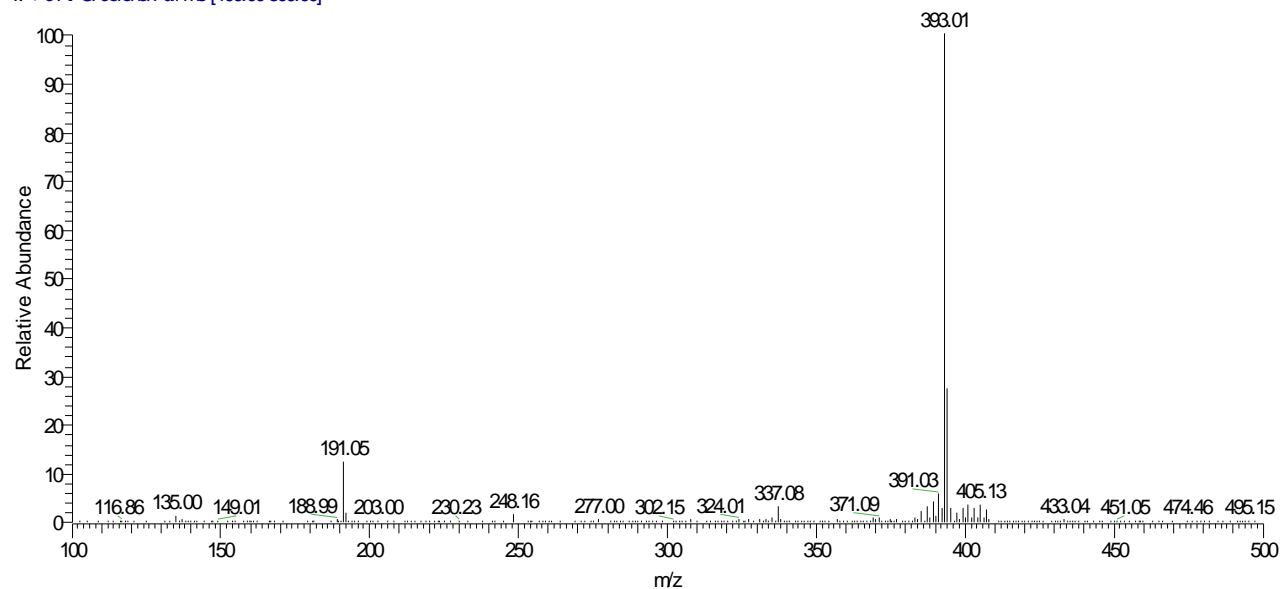
10/11/2007 12:23:31 PM

Eryvarin C

RT: 0.00-31.03 SM: 9G



2007101102 #639-667 RT: 17.15-17.90 AV: 29 SB: 264 14.71-16.73, 18.62-23.56 NL: 2.77E7  
T: + c APCI corona Full ms [100.00-500.00]



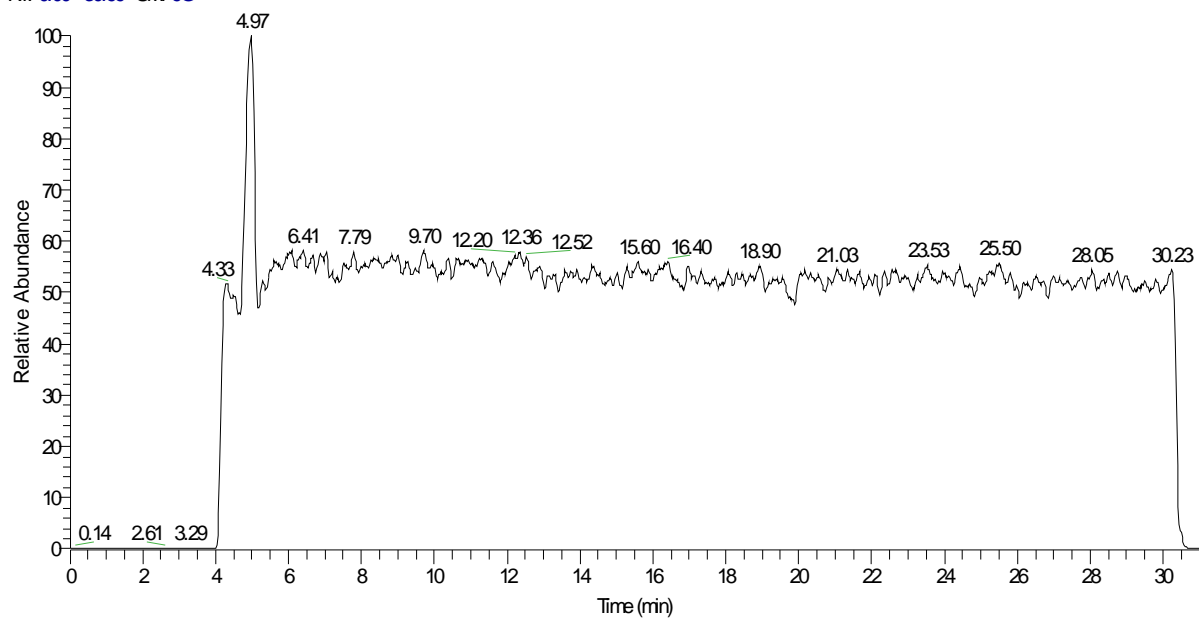
**Vedlegg 30:** LC/MS spektrum 11.2.(7-9), erybraedin C

C:\calibur\...\2007101103

10/11/2007 12:55:38 PM

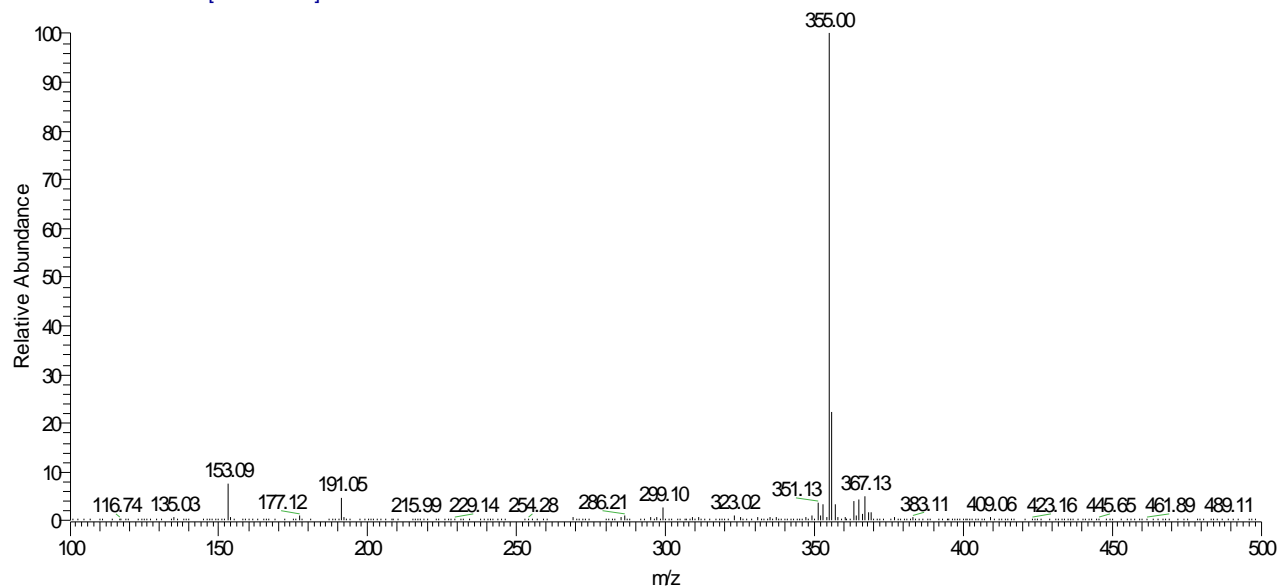
Eryvarin K

RT: 0.00-30.99 SM: 9G



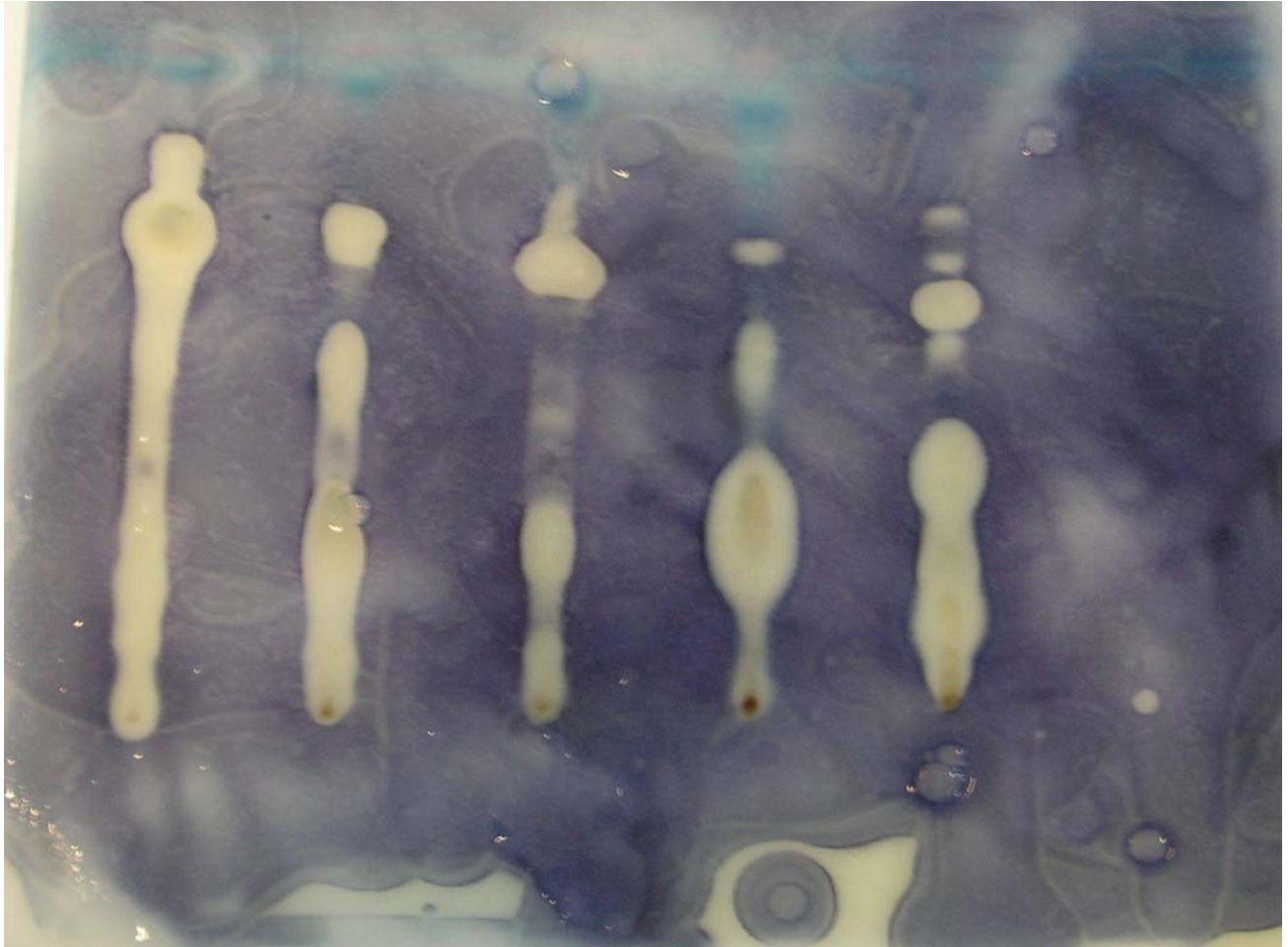
NL:  
8.53E7  
Base Peak  
MS  
2007101103

2007101103 #174-191 RT: 4.73-5.18 AV: 18 SB: 165 5.40-9.76 NL: 6.08E7  
T: + c APCI corona Full ms [100.00-500.00]



**Vedlegg 31:** LC/MS spektrum 11.2.3,4-k, eryvarin K

### 8.3 Antibakterielltest



**Vedlegg 32:** Erybraedin A, erybraedin C, erybraedin D, eryvarin K, DCM-rå og positiv kontroll testet for antibakteriell aktivitet mot *Staphylococcus aureus*

## 9 Referanseliste

Ajaiyeoba, E., Ashidi, J., Abiodun, O., Okpako, L., Ogbole, O., Akinboye, D., Falade, C., Bolaji, O., Gbotosho, G., Falade, M., Itiola, O., Houghton, P., Wright, C. og Oduola, A. (2005). Antimalarial Ethnobotany: In Vitro Antiplasmodial Activity of Seven Plants Identified in the Nigerian Middle Belt. *Pharmaceutical Biology* **42**: 588 - 591.

Atawodi, S. E. (2003). Occurrence of preformed volatile nitrosamines in preparations of some Nigerian medicinal plants: a preliminary report. *Food and Chemical Toxicology* **41**: 551-554.

Atindehou, K., K., Schmid, C., Brun, R., Kone, M. W. og Traore, D. (2004). Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Cote d'Ivoire. *Journal of Ethnopharmacology* **90**: 221-227.

Bah, S., Jäger, A. K., Adersen, A., Diallo, D. og Paulsen, B. S. (2007). Antiplasmodial and GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor binding activities of five plants used in traditional medicine in Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology* **110**: 451-457.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **181**: 1199-1200.

Brink, A., J., Rall, G., J. H. og Engelbrecht, J., P. (1974). Structures of some minor pterocarpanes of *Neorautanenia edulis*. *Phytochemistry* **13**: 1581-1585.

Burkill, H. M. (1985). The useful plants of West Tropical Africa Bind 3. Kew, Royal Botanic Gardens.

CIA. (2007, 17-04-07). "CIA - The World Factbook - Mali." Aksessert 17.april, 2007, fra <https://www.cia.gov/cia/publications/factbook/geos/ml.html>.

Cottiglia, F., Casu, L., Bonsignore, L., Casu, M., Floris, C., Leonti, M., Gertsch, J. og Heilmann, J. (2005). New cytotoxic prenylated isoflavonoids from *Bituminaria morisiana*. *Planta Medica* **71**: 254-260.

Diallo, D., Koumare, M., Traore, A. K., Sanogo, R. og Coulibaly, D. (2003). Collaboration between Traditional Health Practitioners and Conventional Health Practitioner: The Malian Experience. *African Health Monitor* **4**: 35-36.

Dyke, S. F., Quessy, S. N. (1981). The Alkaloids - Chemistry and Physiology Bind 18. New York, Academic Press.

Folkers, K., Shavel, J. og Koniuszy, F. (1941). *Erythrina* Alkaloids. X. Isolation and Characterization of Erysonine and Other Liberated Alkaloids. *Journal of the American Chemical Society* **63**: 1544-1549.

- Fomum, Z., T., Ayafor, J., F., Wandji, J., Gana Fomban, W. og Nkengfack, A., E. (1986). Erythrinasinat, an ester from three *Erythrina* species. *Phytochemistry* **25**: 757-759.
- Fomum, Z. T., Ayafor, J. F., Ifeadike, P. N., Nkengfack, A. E. og Wandji, J. (1986). *Erythrina* studies 3. Isolation of an isoflavone from *Erythrina senegalensis* and *Erythrina excelsa*. *Planta Medica*: 341.
- Fomum, Z. T., Ayafor, J. F. og Wandji, J. (1985). Erythrisenegalone, a prenylated-flavanone from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry* **24**: 3075-3076.
- Fomum, Z. T., Ayafor, J. F. og Wandji, J. (1987). *Erythrina* studies 10. Senegalensein, a novel prenylated flavanone from *Erythrina senegalensis*. *Journal of Natural Products* **50**: 921-922.
- Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K. E. og Karlsen, J. (1998). *Kromatografi: separasjon og deteksjon*, 3.utgave. Bind Oslo, Universitetsforlaget.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. og Williamson, E. M. (2004). *Ethnobotany and Ethnopharmacy. Fundamentals og Pharmacognosy and Phytotherapy*. London, Elsevier Science: 48-58.
- Inngjerdingen, K., Nergård, C. S., Diallo, D., Mounkoro, P. P. og Paulsen, B. S. (2004). An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology* **92**: 233-244.
- ITIS. (2007, 1999). "ITIS Report, *Erythrina* L." Aksessert 6.aug, 2007, fra [www.itis.usda.gov](http://www.itis.usda.gov).
- Kitagawa, I., Chen, W., Hori, K., Harada, E., Yasuda, N., Yoshikawa, M. og Ren, J. (1994). Chemical studies of chinese licorice-roots. I. Elucidation of five new flavonoid constituents from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L. collected in Xinjiang. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **42**: 1056-1062.
- Kone, W. M., Atindehou, K. K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traore, D. og Dosso, M. (2004). Traditional medicine in North Cote-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **93**: 43-49.
- Lane, G., A., Biggs, D., R., Russell, G., B., Sutherland, O., R., W., Williams, E., M., Maindonald, J., H. og Donnell, D., J. (1985). Isoflavonoid feeding deterrents for *Costelytra zealandica*. *Journal of Chemical Ecology* **11**: 1713-1735.
- Lyckander, I. M. og Malterud, K. E. (1996). Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids **54**: 239-246.
- Malterud, K. E. (2003). Procedure for assay of 15-lipoxygenase inhibition. Internt notat, Farmasøytisk Institutt, Seksjon for Farmakognosi, Universitet i Oslo: 1-7.

- Malterud, K. E. (2006). ADA. Forelesningsnotater, seminar ved Farmasøytisk Institutt, seksjon for farmakognosi, Universitet i Oslo.
- Malterud, K. E. (2007). Bioassay metoder. Forelesningsnotater i FRM4030, Farmasøytisk Institutt, Universitet i Oslo.
- Maurich, T., Iorio, M., Chimenti, D. og Turchi, G. (2006). Erybraedin C and bitucarpin A, two structurally related pterocarpan purified from *Bituminaria bituminosa*, induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines MMR- and p53-proficient and -deficient in a dose-, time-, and structure-dependent fashion. *Chemico-Biological Interactions* **159**: 104-116.
- Maurich, T., Pistelli, L. og Turchi, G. (2004). Anti-clastogenic activity of two structurally related pterocarpan purified from *Bituminaria bituminosa* in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **561**: 75-81.
- Maydell, H.-J. v. (1990). Trees and shrubs of the Sahel: their characteristics and uses Bind 1. Weikersheim, Verlag Josef Margraf.
- McMurry, J. (2000). Organic chemistry Bind 5. Pacific Grove, Brooks/Cole.
- Mitscher, L. A., Okwute, S. K., Gollapudi, S. R., Drake, S. og Avona, E. (1988a). Antimicrobial pterocarpan of Nigerian *Erythrina mildbraedii*. *Phytochemistry* **27**: 3449-52.
- Mitscher, L. A., Okwute, S. K., Gollapudi, S. R. og Keshavarz-Shokri, A. (1988b). Antimicrobial agents from higher plants. The isolation and structural characterization of two additional pterocarpan antimicrobial agents from Nigerian *Erythrina mildbraedii*. *Heterocycles* **27**: 2517-22.
- Miyase, T., Sano, M., Yoshino, K. og Nonaka, K. (1999). Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (II). *Phytochemistry* **52**: 311-319.
- Newman, D., J. og Cragg, G., M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* **70**: 461-477.
- Nkengfack, A. E., Vardamides, J. C., Fomum, Z. T. og Meyer, M. (1995). Prenylated isoflavanone from *Erythrina eriotricha*. *Phytochemistry* **40**: 1803-8.
- Oh, W. K., Kim, B. Y., Oh, H., Kim, B. S. og Ahn, J. S. (2005). Phospholipase C gamma 1 inhibitory activities of prenylated flavonoids isolated from *Erythrina senegalensis*. *Planta Medica* **71**: 780-782.
- Oh, W. K., Lee, H. S., Ahn, S. C., Ahn, J. S., Mbafor, J. T., Wandji, J., Fomum, Z. T., Chang, H. K. og Kim, Y. H. (1999). Erythrina studies part 36 - Prenylated isoflavanoids from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry* **51**: 1147-1150.

- Oh, W. K., Lee, H. S., Kim, B. Y., Chang, H. K., Kim, Y. H., Wandji, J., Mbafor, J. T., Fomum, Z. T. og Ahn, J. S. (1998). Inhibition of phospholipase C activity by auriculatin and 8-prenylluteone isolated from *Erythrina senegalensis*. *Phytotherapy Research* **12**: 9-12.
- Okpako, D. T. (1999). Traditional African medicine: theory and pharmacology explored. *Trends in Pharmacological Sciences* **20**: 482-485.
- Pedersen-Bjergaard, S. (2005). *Spektroskopiske metoder for legemiddelanalyse Bind 2*. Oslo, Unipub AS.
- Pistelli, L., Noccioli, C., Appendino, G., Bianchi, F., Sterner, O. og Ballero, M. (2003). Pterocarpanes from *Bituminaria morisiana* and *Bituminaria bituminosa*. *Phytochemistry* (Elsevier) **64**: 595-598.
- Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon* **39**: 603-613.
- Reubsaet, L. (2006). HPLC - MS/MS, High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Forelesningsnotater*: 1-24.
- Rosa, A., Deiana, M., Corona, G., Atzeri, A., Incani, A., Appendino, G. og Dessi, M., A. (2005). Antioxidant properties of extracts and compounds from *Psoralea morisiana*. *European Journal of Lipid Science and Technology* **107**: 521-529.
- Rukachaisirikul, T., Innok, P., Aroonrerk, N., Boonamnuaylap, W., Limrangsun, S., Boonyon, C., Woonjina, U. og Suksamrarn, A. (2007). Antibacterial Pterocarpanes from *Erythrina subumbrans*. *Journal of Ethnopharmacology* **110**: 171-175.
- Saidu, K., Onah, J., Orisadipe, A., Olusola, A., Wambebe, C. og Gamaniel, K. (2000). Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. *Journal of Ethnopharmacology* **71**: 275-280.
- Sato, M., Tanaka, H., Oh-Uchi, T., Fukai, T., Etoh, H. og Yamaguchi, R. (2004). Antibacterial activity of phytochemicals isolated from *Erythrina zeyheri* against vancomycin-resistant *Enterococci* and their combinations with vancomycin. *Phytotherapy Research* **18**: 906-910.
- Tanaka, H., Hirata, M., Etoh, H., Magoichi, S., Sato, M., Murata, J., Murata, H., Darnaedi, D. og Fukai, T. (2003). Four new isoflavonoids and a new 2-arylbenzofuran from the roots of *Erythrina variegata*. *Heterocycles* **60**: 2767-2773.
- Tanaka, H., Tanaka, T. og Etoh, H. (1998). Two pterocarpanes from *Erythrina orientalis*. *Phytochemistry* **47**: 475-477.
- Taylor, R. B., Corley, D. G., Tempesta, M. S., Fomum, Z. T., Ayafor, J. F., Wandji, J. og Ifeadike, P. N. (1986). *Erythrina* studies 7. 2,3-dihydroauriculatin, a new prenylated isoflavanone from *Erythrina senegalensis* - Application of the selective INEPT technique. *Journal of Natural Products* **49**: 670-673.



- Theis, A. (2006). *Erythrina senegalensis* - en medisiplante fra Mali: undersøkelse av antifungale komponenter ; etnofarmakologiske studier. Farmasøytisk Institutt, Universitet i Oslo, Hovedfagsavhandling i farmakognosi
- Togola, A., Diallo, D., Dembélé, S., Barsett, H. og Paulsen, B. (2005). Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali, (West Africa) in the regions Doila, Kolokani and Siby. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **1**: 7 (9s).
- Van Heerden, F., R., Brandt, E., V. og Roux, D., G (1978). Structure and synthesis of some complex pyranoisoflavonoids from the bark of *Dalbergia nitidula* Welw. ex Bak. *Journal of American Chemical Society, Perkin Transactions*: 137-145.
- Virginia, W. (2002). "Mali Breakout - Geography." Aksessert 10.oktober, 2007, fra [http://mali.pwnet.org/geography/geography\\_location.htm](http://mali.pwnet.org/geography/geography_location.htm).
- Wandji, J., Awanchiri, S., Taneé Fomum, Z., Tillequin, F. og Libot, F. (1995c). Isoflavones and alkaloids from the stem bark and seeds of *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry* **39**: 677-681.
- Wandji, J., Awanchiri, S. S., Fomum, Z. T., Tillequin, F. og Michel-Daniwicz, S. (1995b). Prenylated isoflavonoids from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry* **38**: 1309-1313.
- Wandji, J., Fomum, Z. T., Tillequin, F., Baudouin, G. og Koch, M. (1994a). Epoxyisoflavones from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry* **35**: 1573-1577.
- Wandji, J., Fomum, Z. T., Tillequin, F., Libot, F. og Koch, M. (1995a). Erysenegalensein B and Erysenegalensein C, 2 new prenylated isoflavanones from *Erythrina senegalensis*. *Journal of Natural Products* **58**: 105-108.
- Wandji, J., Fomum, Z. T., Tillequin, F., Seguin, E. og Koch, M. (1994b). 2 isoflavones from *Erythrina senegalensis*. *Phytochemistry* **35**: 245-248.
- Wandji, J., Nkengfack, A. E., Fomum, Z. T., Ubillas, R., Killday, K. B. og Tempesta, M. S. (1990). A New Prenylated Isoflavone and Long Chain Esters from Two *Erythrina* Species. *Journal of Natural Products* **53**: 1425-1429.
- Wandji, J., Skaltsounis, A. L., Tillequin, F., Koch, M. og Fomum, Z. T. (1994c). Erysenegalenseins H and I: Two New Isoflavones from *Erythrina senegalensis*. *Planta Medica* **60**: 178-80.
- Wanjala, C., C., W., Juma, B., F., Bojase, G., Gashe, B., G. og Majinda, R., R., T. (2002). Erythraline alkaloids and antimicrobial flavonoids from *Erythrina latissima*. *Planta Medica* **68**: 640-642.
- WHO. (2006). "African trypanosomiasis (sleeping sickness). Fact sheet N°259." Aksessert 17.august, 2007, fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>.

WHO. (2007). "Malaria. Fact sheet N°94." Aksessert 17.august, 2007, fra <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>.

Wikipedia. (2007). "Wikipedia - Den frie encyklopedi - Mali." Aksessert 17.april, 2007 fra <http://no.wikipedia.org/wiki/Mali>.

Williams, D. H. og Fleming, I. (1989). Spectroscopic methods in organic chemistry Bind 4. London, McGraw-Hill.

Yenesew, A., Midiwo, J. O., Guchu, S. M., Heydenreich, M. og Peter, M. G. (2002). Three isoflav-3-enes and a 2-arylbenzofuran from the root bark of *Erythrina burttii*. Phytochemistry **59**: 337-341.